

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ANDRESSA CÓRNEO GAZOLA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE
ESPÉCIES DE *Passiflora* DA AMÉRICA DO SUL**

DOUTORADO

FLORIANÓPOLIS
2014

ANDRESSA CÓRNEO GAZOLA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE
ESPÉCIES DE *Passiflora* DA AMÉRICA DO SUL**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo
Schenkel
Coorientadora: Profa. Dra. Thereza
Christina Monteiro de Lima

FLORIANÓPOLIS
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gazola, Andressa Córneo

AVALIAÇÃO QUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES DE
Passiflora DA AMÉRICA DO SUL / Andressa Córneo Gazola ;
orientador, Eloir Paulo Schenkel ; coorientadora, Thereza
Christina Monteiro de Lima. - Florianópolis, SC, 2014.
212 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Passiflora. 3. maracujá. 4. sedativo.
5. flavonoide C-glicosídeo. I. Schenkel, Eloir Paulo. II.
de Lima, Thereza Christina Monteiro. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. IV. Título.

**“AVALIAÇÃO QUÍMICA E
NEUROFARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES DE
PASSIFLORA DA AMÉRICA DO SUL”**

POR

Andressa Córneo Gazola

**Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:**

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maique Weber Biavatti (UFSC – Membro Titular)

Dra. Maria Tereza Rojo de Almeida (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos (UFPR – Membro Titular)

Profa. Dra. Grace Gosmann (UFRGS – Membro Titular)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 30 de setembro de 2014.

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Geraldo e Sestina e ao meu esposo
André. Por todo esforço, incentivo,
carinho, compreensão e amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, que desde meu mestrado vem me orientando e me “aguentando”. Os ensinamentos aprendidos com o senhor serão lembrados e aproveitados durante toda minha vida profissional.

À minha coorientadora Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima que abriu as portas de seu laboratório e permitiu que grande parte do trabalho fosse feito lá. Obrigada também pelas horas de descontração e desabafo que você sempre proporcionou.

À Profa. Dra. Mareni Rocha Farias, pela orientação durante minha iniciação científica, além do carinho e por despertar em mim o interesse na área acadêmica;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, pelo auxílio no trabalho, pelas conversas sobre os rumos e por muitas vezes me ouvir e aconselhar;

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo carinho, atenção e compartilharem seus conhecimentos;

À todos os meus amigos que adquiri ao longo dos anos em que vivi em Florianópolis:

Aqueles presentes todos os dias, os quais não citarei nomes, mas que são mais do que colegas de laboratório, são amigos! Foram ótimos todos os momentos juntos. Sentirei saudades!

Aos amigos e colegas que já passaram pelo laboratório, e que agora, estão aí espalhados pelo Brasil, cada um seguindo seu caminho. Em especial às doutoras Karen e Silvana que além de parceiras durante todo meu mestrado e grande parte do doutorado são amigas para compartilhar desabafos, alegrias, tristezas... Podem ter certeza que levarei vocês para sempre em meu coração.

Ao meu parceiro de trabalho, e mais que isso, grande amigo desde sua chegada em Florianópolis, Geison, que resolveu buscar sua felicidade na Colômbia, mas que está sempre presente em nosso pensamento. Você faz falta!

À Caroline, Tatiana, Ana (small) e Carlos que além de companheiros de trabalho no laboratório são também amigos queridos fora dele, sempre me ajudando quando não pude estar presente em Florianópolis, me dando, além de auxílio, atenção e carinho. Saibam que aqui em casa sempre terá um cantinho para vocês ;)

Aos amigos que conheci durante meu estágio doutoral, principalmente, Angie, Denise, Phryanka, Verena, Sophia and Chrissi. Dankchen!!!! Thanks a bunch for the pleasure time with you! Miss you so much!

Aos demais amigos aqui não citados, mas que passaram pela minha vida, uns mais tempo, outros menos, mas que me fizeram ser quem sou hoje.

Aos meus pais, Geraldo e Sestina por todo esforço que fizeram para eu concluir a faculdade, o mestrado e o doutorado. Sempre me aconselhando e orientando. Muito obrigada! Amo vocês!

Ao meu irmão e minha cunhada, Anderson e Erica, por todos os momentos de carinho. Amo vocês!

Ao meu esposo André, por todo carinho, cumplicidade, apoio, dedicação e principalmente paciência. Te amo!

RESUMO

Espécies do gênero *Passiflora* são utilizadas há muito tempo pela população de vários países como sedativas e calmantes. Na presente tese buscou-se identificar extratos e substâncias isoladas com atividade no Sistema Nervoso Central das espécies *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *mollissima*, de ocorrência na América do Sul. Nesse sentido, avaliou-se a atividade sedativa de quatorze extratos provenientes das folhas, pericarpo ou polpa das várias espécies através do teste do sono induzido por éter etílico em camundongos (v.o.). Os extratos aquosos do pericarpo de *P. alata* (600 mg/kg) e *P. quadrangularis* (100 e 300 mg/kg), das folhas de *P. quadrangularis* (60 mg/kg), *P. edulis* f. *edulis* (600 mg/kg) e *P. manicata* (100 mg/kg) e da polpa de *P. ligularis* (30, 100 e 300 mg/kg) foram ativos nesses testes. Os extratos das folhas e do pericarpo de *P. quadrangularis* foram escolhidos para a realização de outros testes neurofarmacológicos e para o fracionamento bioquímico pela atividade sedativa. Além da atividade sedativa, o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* apresentou atividade tipo-ansiolítica nos testes de transição claro-escuro (100 mg/kg) e de esconder esferas (600 mg/kg). Na investigação da composição fitoquímica, foi observada a presença de flavonoides em todos os extratos, sendo identificadas a apigenina e a vitexina-2''-O-xilosídeo como os flavonoides majoritários dos extratos do pericarpo e folhas de *P. quadrangularis*, respectivamente. Observou-se, ainda, a presença de saponinas e aminoácidos no extrato das folhas de *P. quadrangularis*. A apigenina foi avaliada no teste do sono induzido por éter etílico, no qual mostrou atividade sedativa (0,6 mg/kg) sugerindo ser o principal composto responsável por essa atividade do extrato. Para o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* realizou-se o fracionamento químico, o qual forneceu três frações distintas enriquecidas em aminoácidos, saponinas e flavonoides. Foi observada a atividade sedativa apenas na fração enriquecida em flavonoides (6 mg/kg), o que indica uma correlação entre a atividade sedativa do extrato e os flavonoides presentes. O flavonoide majoritário desse extrato, a vitexina-2''-O-xilosídeo, foi isolado e avaliado no teste do sono induzido por éter etílico, apresentando atividade sedativa (1,0 e 6,0 mg/kg), sendo, por isso, considerado um dos compostos responsáveis pela atividade sedativa. Após a observação da atividade sedativa dos flavonoides apigenina e vitexina-2''-O-xilosídeo, o envolvimento da via

GABAérgica no mecanismo de ação sedativa desses flavonoides foi avaliado pelo teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil (*in vivo*) e teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* (*in vitro*). Os resultados permitiram concluir que os flavonoides, após administração oral, parecem atuar via receptores GABA_A benzodiazepínicos, porém o mecanismo molecular necessita ainda ser melhor elucidado.

ABSTRACT

Species of the genus *Passiflora* are used in traditional medicine of many countries as sedatives and mild tranquilizers. In this thesis, we attempted to identify extracts and isolated compounds with Central Nervous System activity from the species *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* and *P. tripartita* f. *mollissima*. The sedative activity of fourteen aqueous extracts from leaves, pericarp or pulp of the species was assessed through the ethyl ether-induced hypnosis test in mice (p.o.). The active extracts were the pericarp extracts of *P. alata* (600 mg/kg) and *P. quadrangularis* (100 and 300 mg/kg), the leaves extracts of *P. quadrangularis* (60 mg/kg), *P. edulis* f. *edulis* (600 mg/kg) and *P. manicata* (100 mg/kg) and the pulp of *P. ligularis* (30, 100 and 300 mg/kg). The extracts from leaves and pericarp of *P. quadrangularis* were evaluated in other neuropharmacological tests and the fractionation of the extracts was bioguided by the sedative activity. The aqueous extract obtained from the pericarp of *P. quadrangularis* showed anxiolytic-like activity in the light-dark transitions (100 mg/kg) and marble burying tests (600 mg/kg). The investigation of the compounds present in the extracts showed the presence of flavonoids in all extracts and we have identified apigenin and vitexin-2''-O-xyloside as the major flavonoids in pericarp and leaves extracts of *P. quadrangularis*, respectively. The presence of saponins and amino acids in the leaves extract of *P. quadrangularis* was also observed. Apigenin showed sedative activity (0,6 mg/kg) in the ethyl ether-induced hypnosis test suggesting that the main compound is responsible for this activity of the extract. For the aqueous extract from leaves of *P. quadrangularis* were obtained three distinct fractions enriched in amino acids, saponins and flavonoids. Only the fraction enriched in flavonoids showed sedative activity (6 mg/kg), which indicates a correlation between the sedative activity of the extract and the flavonoids composition. The major flavonoid of this extract, vitexin-2''-O-xyloside, was evaluated in the ethyl ether-induced hypnosis test, showing sedative activity (1,0 and 6,0 mg/kg). The involvement of GABAergic pathway in the action mechanism of action of apigenin and vitexin-2''-O-xyloside was evaluated in an *in vivo* and an *in vitro* test. The *in vivo* results suggest that the flavonoids can activate de GABAergic pathway through GABA_A receptors after oral

administration of the extracts, but the molecular mechanism needs to be elucidated yet.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	31
CAPÍTULO 1. Revisão da Literatura.....	39
1.1. O Gênero <i>Passiflora</i>	41
1.2. Passifloras e o Sistema Nervoso Central.....	42
1.3. Espécies de passifloras da Colômbia e Brasil do presente estudo.....	43
1.3.1. <i>Passiflora alata</i> Curtis.....	43
1.3.1.1. Composição química descrita para <i>P. alata</i>	44
1.3.1.2. Atividades neurofarmacológicas descritas para <i>P. alata</i>	47
1.3.2. <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>	49
1.3.2.1. Composição química descrita para <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	51
1.3.2.2. Atividades neurofarmacológicas descritas para <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	52
1.3.3. <i>Passiflora ligularis</i> Juss.....	52
1.3.3.1. Composição química descrita para <i>P. ligularis</i>	53
1.3.4. <i>Passiflora manicata</i> Juss.....	54
1.3.4.1. Composição química descrita para <i>P. manicata</i>	55
1.3.5. <i>Passiflora quadrangularis</i> Linneaus.....	56
1.3.5.1. Composição química descrita para <i>P. quadrangularis</i>	56
1.3.5.2. Atividades neurofarmacológicas descritas para <i>P. quadrangularis</i>	58

1.3.6. <i>Passiflora tripartita</i> f. <i>mollissima</i> Holm-Nielsen & Møller Jørgensen.....	59
1.3.6.1. Composição química descrita para <i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i>	60
CAPÍTULO 2. Análises cromatográficas e triagem neurofarmacológica dos extratos das espécies de <i>Passiflora</i>	63
2.1. Introdução.....	65
2.2. Objetivos específicos.....	65
2.3. Material e métodos.....	66
2.3.1. Materiais vegetais.....	67
2.3.1.1. Obtenção dos extratos vegetais.....	67
2.3.2. Solventes, reagentes, fármacos e outros materiais utilizados.....	68
2.3.3. Análise cromatográfica dos extratos.....	69
2.3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	69
2.3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	69
2.3.3.2.1. Análise de flavonoides glicosilados.....	70
2.3.3.2.2. Análise das agliconas de flavonoides.....	70
2.3.4. Avaliação das atividades neurofarmacológicas.....	70
2.3.4.1. Animais.....	70
2.3.4.2. Avaliação da atividade sedativa.....	71
2.3.4.2.1. Teste do sono induzido por éter etílico.....	71
2.3.4.1. Análise estatística.....	72

2.4.	Resultados e discussão.....	73
2.4.1.	Triagem neurofarmacológica.....	73
2.4.1.1.	Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. alata</i> ...	74
2.4.1.2.	Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	76
2.4.1.3.	Extrato aquoso da polpa de <i>P. ligularis</i>	77
2.4.1.4.	Extrato aquoso das folhas de <i>P. manicata</i>	78
2.4.1.5.	Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. quadrangularis</i>	78
2.4.1.6.	Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i>	80
2.4.2.	Análise dos flavonoides presentes nos extratos vegetais.....	81
2.4.2.1.	Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. alata</i>	82
2.4.2.2.	Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	84
2.4.2.3.	Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes no extrato aquoso da polpa de <i>P. ligularis</i>	86
2.4.2.4.	Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes no extrato aquoso das folhas de <i>P. manicata</i>	86
2.4.2.5.	Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. quadrangularis</i>	88

2.4.2.6. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de <i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i>	90
2.4.2.7. Caracterização de agliconas de flavonoides presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa das espécies de <i>Passiflora</i>	92
2.4.3. Seleção de extratos para estudos mais aprofundados.....	93
2.5. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	94
CAPÍTULO 3. Avaliação das atividades no SNC e fracionamento fitoquímico bioguiado dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	
3.1. Introdução.....	99
3.1.1. A técnica eletrofisiológica do tipo <i>voltage clamp</i> e os receptores GABAérgicos.....	99
3.2. Objetivos específicos.....	102
3.3. Material e métodos.....	103
3.3.1. Solventes, reagentes, fármacos e outros materiais utilizados.....	104
3.3.2. Análises cromatográficas.....	105
3.3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	105
3.3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	106
3.3.2.2.1. Análise dos flavonoides.....	106
3.3.2.2.2. Análise das saponinas.....	106

3.3.3. Fracionamento bioguiado do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	107
3.3.3.1. Obtenção das frações enriquecidas em aminoácidos, flavonoides e saponinas.....	107
3.3.3.1.1. Separação da fração enriquecida em aminoácidos.....	107
3.3.3.1.2. Separação das frações enriquecidas em saponinas e flavonoides.....	108
3.3.3.2. Obtenção do flavonoide majoritário do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> – vitexina-2''-O-xilosídeo.....	108
3.3.4. Obtenção do flavonoide majoritário do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> – apigenina.....	109
3.3.5. Avaliação das atividades neurofarmacológicas.....	109
3.3.5.1. Animais.....	109
3.3.5.2. Avaliação da atividade sedativa.....	109
3.3.5.2.1. Teste do sono induzido por éter etílico.....	109
3.3.5.2.2. Teste do sono induzido por pentobarbital.....	109
3.3.5.3. Avaliação da atividade tipo-ansiolítica.....	110
3.3.5.3.1. Teste de transições claro-escuro.....	110
3.3.5.3.2. Teste de esconder esferas.....	111
3.3.5.3.3. Teste do campo aberto.....	112
3.3.5.4. Avaliação da atividade tipo-antidepressiva.....	113
3.3.5.4.1. Teste de suspensão pela cauda.....	113

3.3.5.5.	Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	114
3.3.5.5.1.	Teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol...	114
3.3.5.5.2.	Teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo.....	115
3.3.6.	Avaliação do envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa dos flavonoides majoritários dos extratos de <i>P. quadrangularis</i>	116
3.3.6.1.	Teste do sono induzido por éter etílico após administração de flumazenil.....	117
3.3.6.2.	Teste eletrofisiológico do tipo <i>voltage clamp</i>	117
3.3.7.	Análise estatística.....	119
3.4.	Resultados e discussão.....	119
3.4.1.	Estudo do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i>	119
3.4.1.1.	Avaliação da atividade tipo-ansiolítica.....	119
3.4.1.1.1.	Teste de transições claro-escuro.....	120
3.4.1.1.2.	Teste de esconder esferas.....	121
3.4.1.1.3.	Teste do campo aberto.....	122
3.4.1.2.	Avaliação da atividade tipo-antidepressiva.....	124
3.4.1.2.1.	Teste de suspensão pela cauda.....	125
3.4.1.3.	Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	126
3.4.1.3.1.	Teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol...	126

3.4.1.3.2. Teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo.....	127
3.4.1.4. Avaliação da composição química do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i>	128
3.4.1.5. Avaliação das atividades tipo-ansiolítica e sedativa da apigenina <i>in vivo</i>	129
3.4.1.5.1. Avaliação da atividade tipo-ansiolítica pelo teste de transições claro-escuro da apigenina.....	129
3.4.1.5.2. Avaliação da atividade sedativa da apigenina pelos testes de sono induzido por éter etílico e por pentobarbital.....	130
3.4.1.6. Avaliação do envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa da apigenina.....	132
3.4.1.6.1. Teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil.....	132
3.4.1.6.2. Teste eletrofisiológico do tipo <i>voltage clamp</i>	133
3.4.2. Estudo do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	136
3.4.2.1. Avaliação da atividade tipo-ansiolítica.....	136
3.4.2.1.1. Teste de transições claro-escuro.....	136
3.4.2.1.2. Teste de esconder esferas.....	137
3.4.2.1.3. Teste do campo aberto.....	138
3.4.2.2. Avaliação da composição química e obtenção das frações enriquecidas nos principais metabólitos.....	140

3.4.2.2.1. Obtenção das frações enriquecidas em aminoácidos, saponinas e flavonoides.....	142
3.4.2.3. Avaliação da atividade sedativa das frações enriquecidas em aminoácido, saponinas e flavonoides.....	145
3.4.2.4. Obtenção do flavonoide majoritário vitexina-2''-O-xilosídeo.....	146
3.4.2.5. Avaliação da atividade sedativa de vitexina-2''-O-xilosídeo no teste do sono induzido por éter e pentobarbital.....	147
3.4.2.6. Avaliação do envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa de vitexina-2''-O-xilosídeo.....	149
3.4.2.6.1. Teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil.....	149
3.4.2.6.2. Teste eletrofisiológico do tipo <i>voltage clamp</i>	150
3.5. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	151
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	155
REFERÊNCIAS.....	165
ANEXOS.....	191
Anexo A – Trabalhos publicados em revistas científicas e apresentados em congressos.....	193
APÊNDICES.....	197
Apêndice A – Quadro descritivo apresentando as estruturas químicas dos principais metabólitos químicos das espécies de <i>Passiflora</i> utilizadas.....	199

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Imagens da flor, folhas e frutos verdes (A) e maduro (B) de <i>P. alata</i> . As estruturas dos frutos de <i>Passifloras</i> são destacadas na imagem B.	44
Figura 1.2: Imagens da flor, folhas, frutos íntegros (A) e partido (B) de <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	50
Figura 1.3: Imagens das folhas, flor (A), frutos íntegros (B) e partidos (C) de <i>P. ligularis</i>	53
Figura 1.4: Imagem das folhas, flor e fruto (em destaque) de <i>P. manicata</i>	55
Figura 1.5: Imagens da flor (A) e dos frutos (B e C) de <i>P. quadrangularis</i>	56
Figura 1.6: Imagens das flores, folhas (A) e frutos (B e C) de <i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i>	59
Figura 2.1: Esquema representativo da abordagem utilizada na triagem neurofarmacológica e na avaliação da composição química realizada com os extratos aquosos obtidos de todas as espécies de <i>Passiflora</i> do presente trabalho.	66
Figura 2.2: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos das folhas, do pericarpo e/ou da polpa das espécies de <i>Passiflora</i> no teste do sono induzido por éter etílico.	71
Figura 2.3: Efeitos do tratamento oral (gavagem) dos extratos aquosos da polpa, pericarpo e folhas de <i>P. alata</i> (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.	74

Figura 2.4: Efeitos do tratamento oral dos extratos aquosos da polpa, pericarpo e folhas de <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.	76
Figura 2.5: Efeitos do tratamento oral do extrato aquoso da polpa de <i>P. ligularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.....	77
Figura 2.6: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de <i>P. manicata</i> (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.....	78
Figura 2.7: Efeitos do tratamento oral com os extratos aquosos da polpa (A - 100, 300 e 600 mg/kg), pericarpo (B - 100, 300 e 600 mg/kg) e folhas (C - 100, 300 e 600 mg/kg e D - 30, 60, 100, 300 e 600 mg/kg) de <i>P. quadrangularis</i> na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.	79
Figura 2.8: Efeitos do tratamento oral com os extratos aquosos da polpa (A - 100, 300 e 600 mg/kg), pericarpo (B - 100, 300 e 600 mg/kg) e folhas (C - 100, 300 e 600 mg/kg e D - 60, 100, 300 e 600 mg/kg) de <i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.	81
Figura 2.9: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de <i>Passiflora alata</i> para visualização dos flavonoides glicosilados.	83
Figura 2.10: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i> para visualização dos flavonoides glicosilados.....	85
Figura 2.11: Cromatograma do extrato aquoso obtido da polpa de <i>Passiflora ligularis</i> para visualização dos flavonoides glicosilados.	86

Figura 2.12: Cromatograma do extrato aquoso obtido das folhas de <i>Passiflora manicata</i> para visualização dos flavonoides glicosilados.	87
Figura 2.13: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de <i>Passiflora quadrangularis</i> para visualização dos flavonoides glicosilados.	89
Figura 2.14: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de <i>Passiflora tripartita</i> f. <i>mollissima</i> para visualização dos flavonoides glicosilados.	91
Figura 2.15: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos do pericarpo de <i>Passiflora alata</i> (A) e <i>Passiflora quadrangularis</i> (B) para visualização das agliconas de flavonoides.	92
Figura 2.16: Esquema representativo do prosseguimento dado aos extratos aquosos mais ativos na triagem neurofarmacológica.....	94
Figura 3.1: Esquema representativo do receptor GABA _A com suas 5 subunidades transmembranais compostas pelas subfamílias α , β , γ , δ , ϵ , θ e π e os locais de ligação do ácido γ -aminobutírico (GABA) e dos fármacos benzodiazepínicos (BZDs).....	100
Figura 3.2: Esquemas representativos e fotografia de uma câmara de perfusão para a técnica eletrofisiológica do tipo <i>voltage clamp</i> com dois microeletrodos.....	101
Figura 3.3: Esquema representativo dos procedimentos realizados para os testes neurofarmacológicos e fracionamento bioguiado do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i>	102
Figura 3.4: Esquema representativo dos procedimentos realizados para os testes neurofarmacológicos e fracionamento bioguiado do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	103

Figura 3.5: Esquema representativo do fracionamento do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> para obtenção das frações enriquecidas nos metabólitos majoritários do extrato.	107
Figura 3.6: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos compostos isolados dos extratos aquosos das folhas, do pericarpo de <i>Passiflora quadrangularis</i> no teste do sono barbitúrico.	110
Figura 3.7: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de <i>P. quadrangularis</i> no teste de transições claro-escuro.	111
Figura 3.8: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de <i>P. quadrangularis</i> no teste de esconder esferas.	112
Figura 3.9: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de <i>P. quadrangularis</i> no teste do campo aberto.	112
Figura 3.10: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> no teste de suspensão pela cauda.	114
Figura 3.11: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.	115
Figura 3.12: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo.	116
Figura 3.13: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos compostos isolados dos extratos aquosos das folhas e do	

pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> no teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil.	117
Figura 3.14: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de transições claro-escuro em camundongos.	121
Figura 3.15: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de esconder esferas em camundongos.....	122
Figura 3.16: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade motora no teste do campo aberto em camundongos.....	123
Figura 3.17: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade ansiolítica no teste do campo aberto em camundongos.....	124
Figura 3.18: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda em camundongos.....	126
Figura 3.19: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos.....	127
Figura 3.20: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo em camundongos.....	128

Figura 3.21: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (0,1, 0,3 e 0,6 mg/kg) no teste de transições claro-escuro em camundongos.	130
Figura 3.22: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.	131
Figura 3.23: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (API) (0,6 mg/kg) no teste de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.	131
Figura 3.24: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (API - 0,6 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos pré-tratados com flumazenil (FMZ – 1,0 mg/kg, <i>i.p.</i>).....	133
Figura 3.25: Modulação da corrente de cloreto induzida pelo controle GABA (I_{GABA}) na presença de apigenina em diferentes concentrações.	134
Figura 3.26: Modulação da corrente de cloreto induzida pelo controle GABA (I_{GABA}) na presença de luteolina em diferentes concentrações.	135
Figura 3.27: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de transições claro-escuro em camundongos.....	137
Figura 3.28: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de esconder esferas em camundongos.	138
Figura 3.29: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade motora no teste do campo aberto em camundongos.	139

Figura 3.30: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade ansiolítica no teste do campo aberto em camundongos.....	139
Figura 3.31: Cromatografias em camada delgada do extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora quadrangularis</i> reveladas com anisaldeído sulfúrico (A) e com ninhidrina (B).....	140
Figura 3.32: Cromatogramas do extrato aquoso obtido das folhas (A) de <i>Passiflora quadrangularis</i> e de uma mistura de saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> (B) buscando a visualização de saponinas.	141
Figura 3.33: Cromatografias em camada delgada comparativas do extrato aquoso obtido das folhas de <i>Passiflora quadrangularis</i> com padrões de aminoácidos.	142
Figura 3.34: Cromatografias em camada delgada das frações enriquecidas nos compostos majoritários do extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora quadrangularis</i> reveladas com reagente natural/UV 365nm (A), anisaldeído sulfúrico (B) e ninhidrina (C).	143
Figura 3.35: Comparação dos cromatogramas das frações enriquecidas em flavonoides (FRflaPqF), aminoácidos (FRaaPqF) e saponinas (FRsapPqF) obtidas do extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora quadrangularis</i> , para a visualização dos flavonoides glicosilados (340 nm).	144
Figura 3.36: Cromatografias em Camada Delgada Comparativa da fração rica em aminoácidos proveniente do extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora. quadrangularis</i> (FRaaPqF) com GABA.	145

Figura 3.37: Efeitos do tratamento oral com a fração enriquecida em aminoácidos (FRaaPqF), da fração enriquecida em flavonoides (FRflaPqF) e da fração enriquecida em saponinas (FRsapPqF) (6,0 mg/kg) do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.....	146
Figura 3.38: Efeitos do tratamento oral com a vitexina-2''- <i>O</i> -xilósídeo (1,0; 3,0 e 6,0mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.	147
Figura 3.39: Efeitos do tratamento oral (gavagem) da vitexina-2''- <i>O</i> -xilósídeo (V2OX) (1,0 mg/kg) no teste de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.	148
Figura 3.40: Efeitos do tratamento oral com a vitexina-2''- <i>O</i> -xilósídeo (V2OX – 1,0 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos pré-tratados com flumazenil (FMZ – 1,0 mg/kg, <i>i.p.</i>).	150
Figura 3.41: Modulação da corrente de cloreto induzida pelo controle GABA (I_{GABA}) na presença de vitexina-2''- <i>O</i> -xilósídeo em diferentes concentrações.....	151

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro A: Quadro descritivo apresentando alguns medicamentos fitoterápicos sedativos contendo extratos de <i>Passiflora</i> comercializados no Brasil.....	34
Quadro 2.1: Dados referentes à coleta dos materiais vegetais das espécies de <i>Passiflora</i> do presente trabalho.....	67
Tabela 2.1: Dados de validação para apigenina por CLAE-DAD.....	93
Quadro B: Quadro descritivo apresentando as estruturas químicas dos principais metabólitos químicos das espécies de <i>Passiflora</i> utilizadas no presente trabalho doutoral.....	199

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD – Cromatografia em camada delgada
CCDC - Cromatografia em camada delgada comparativa
CG – Cromatografia gasosa
CGC – Cromatografia gasosa capilar
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD – Detecção de arranjo de diodos
DEPC – Pirocarbonato de dietila
ECM – Eletrochoque transcorneal máximo
FMZ – Flumazenil
GABA – Ácido gama-aminobutírico
i.p. – Intraperitoneal
CL – Cromatografia líquida
EM – Espectroscopia de massas
MS-222 – Metanossulfonato de tricafina
PTZ – Pentilenotetrazol
SNC – Sistema nervoso central
UV – Ultravioleta
v.o. – Via oral

APRESENTAÇÃO

As plantas apresentam uma grande variedade e complexidade de substâncias ativas e é por este motivo que muitas espécies eram e são utilizadas terapeuticamente. Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser constatado nas farmacopeias da época. No início do século XX, esses recursos começaram a ser estudados intensamente, resultando na descoberta de muitas substâncias ativas, ainda hoje importantes na terapêutica como a morfina, a quinina, a digoxina, entre outras (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO, 2007).

Também merece destaque o uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de fármacos. Um exemplo marcante é representado pelo trabalho de Russell E. Marker sobre a semisíntese da progesterona a partir de saponinas isoladas de *Dioscorea macrostachya* Benth., trabalho esse que contribuiu significativamente para a descoberta da pílula anticoncepcional (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO, 2003). Outras classes terapêuticas também foram desenvolvidas a partir de substâncias obtidas de plantas, alguns exemplos são os hipno-analgésicos (derivados da morfina), grande parte dos antimaláricos (provenientes da modulação da molécula da quinina), os anestésicos locais (cujo protótipo foi a cocaína), os agentes anticolinérgicos (derivados da fisostigmina). Essa importância das plantas bioativas como fonte de fármacos permanece relevante no início do século XXI, como exemplifica o desenvolvimento da rivastigmina, utilizada no tratamento da doença de Alzheimer e do taxol utilizado como protótipo para o desenvolvimento de fármacos antitumorais (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO, 2003).

Além disso, as plantas são de grande importância para o desenvolvimento e produção de medicamentos contendo exclusivamente extratos vegetais, tais como produtos à base de *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Matricaria recutita*, *Petasites hybridus* (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003).

Cabe ainda destacar um estudo que mostrou que aproximadamente 50% de todos os novos componentes ativos de medicamentos colocados no mercado no período de 1º de janeiro de 1981 até 31 de dezembro de 2010 estão, direta ou indiretamente, relacionados aos produtos naturais, o que mostra a grande importância dos mesmos na produção de medicamentos (NEWMANN; CRAGG, 2012).

Com relação aos transtornos psiquiátricos, verifica-se que há evidências para o uso de alguns fitoterápicos, como o hipérico, para o tratamento da depressão, mas os dados quanto à eficiência de diversas outras espécies, como *Rhodiola rosea*, *Crocus sativus*, *Passiflora incarnata*, *Scutellaria lateriflora* e *Zizyphus jujuba* são ainda considerados insuficientes (SARRIS, 2007).

Espécies vegetais do gênero *Passiflora* são utilizadas tradicionalmente na medicina popular como sedativas, calmantes e no tratamento e prevenção da irritabilidade, insônia e nervosismo (PIO CORREA, 1978). Um grande número de espécies de *Passiflora* faz parte de sistemas terapêuticos tradicionais de vários países e, na década passada, houve um aumento na comercialização no Brasil de fitoterápicos indicados em transtornos mentais, sendo esses muitas vezes produzidos e comercializados sem o respaldo de estudos controlados (ANDREATINI, 2000). Exemplos de medicamentos fitoterápicos ansiolíticos a base de *Passiflora* comercializados no país são descritos no quadro A. Nele fica evidente que apesar de *P. incarnata* não ser originária do país é a principal espécie utilizada na produção de medicamentos. Além disso, percebe-se a existência de medicamentos contendo extratos de *P. alata* e não fica claro a existência de estudos acerca da toxicidade desses medicamentos. Nesse sentido, vale mencionar que recentemente foi descrito que extratos dessa espécie apresentaram efeitos genotóxicos em camundongos e ratos (BOEIRA et al., 2010), inibição do ganho de peso e algumas alterações hepáticas em camundongos (BRAGA et al., 2013).

Quadro A: Quadro descritivo apresentando alguns medicamentos fitoterápicos sedativos contendo extratos de *Passiflora* comercializados no Brasil.

	Nome comercial	Laboratório	Apresentação	Composição	Posologia
<i>Passiflora incarnata</i>	<i>Passiene</i>	Herbarium	Solução oral	<i>Passiflora incarnata</i> (75 mg/ml)	Ingerir 5 ml, via oral, quatro vezes ao dia.
	<i>Maracujá</i>	Herbarium	Comprimidos revestidos	<i>Passiflora incarnata</i> (320 mg)	Ingerir dois comprimidos, via oral, três vezes ao dia.
	<i>Tensart</i>	Myralis Pharma	Comprimidos revestidos	<i>Passiflora incarnata</i> (360 mg e 857 mg)	Tensart 360 mg → 1 a 2 comprimidos, 2 vezes ao dia. Tensart 857 mg → 1 comprimido, 1 vez ao dia.
	<i>Sintocalmy</i>	Aché	Solução oral	<i>Passiflora</i>	Solução 30 mg/ml

				<i>incarnata</i> (30 mg/ml e 150 mg/ml)	→ 10 ml, 1 a 3 vezes ao dia. Solução 150 mg/ml → 2 ml, 1 a 3 vezes ao dia.
	<i>PassiPax</i>	Bionatus	Solução oral	<i>Passiflora incarnata</i> 1 mg/ml	20 ml, 1 a 3 vezes ao dia.
	<i>Seakalm</i>	Grupo Natulab	Comprimidos revestidos	<i>Passiflora incarnata</i> 260 mg	2 comprimidos, 2 vezes ao dia.
	<i>Maracujá concentrix</i>	Legrand – EMS	Solução oral	<i>Passiflora incarnata</i> (0,1 ml/ml); <i>Salix alba</i> (0,07 ml/ml); <i>Crataegus oxyacantha</i> (50 mg/ml)	Lactentes → ½ colher (2,5 ml), 1 ou 2 vezes ao dia; Crianças de 2 a 5 anos → 1 colher (5 ml), 1 ou 2 vezes ao dia; Crianças maiores de 5 anos → 2 colheres (10 ml), 1 ou 2 vezes ao dia; Adultos → 3 a 4 colheres (15 a 20 ml), 1 ou 2 vezes ao dia.
	<i>Pasalix</i>	Marjan Farma	Comprimidos revestidos	<i>Passiflora incarnata</i> (100 mg); <i>Salix alba</i> (100 mg); <i>Crataegus oxyacantha</i> (30 mg)	Adultos → 1 a 2 comprimidos, 1 ou 2 vezes ao dia.
<i>Passiflora alata</i>	<i>Maracugin a</i>	D.M. Dorsay	Comprimidos revestidos	<i>Passiflora alata</i> (25 mg); <i>Erythrina mulungu</i> (12,5 mg); <i>Crataegus oxyacantha</i> (12,5 mg)	Adultos → 1 a 2 comprimidos, 3 vezes ao dia após às refeições.
			Solução oral	<i>Passiflora alata</i> (0,13 ml/ml); <i>Erythrina mulungu</i> (0,07 ml/ml); <i>Crataegus</i>	Uma colher das de chá, três vezes ao dia.

				<i>oxyacantha</i> (0,07 ml/ml)	
	<i>Pasaneuro</i>	Bunker	Comprimidos revestidos	<i>Passiflora alata</i> (100 mg); <i>Erythrina mulungu</i> (50 mg); <i>Matricaria chamomilla</i> (50 mg)	Distonias neuro-vegetativas → 1 a 2 comprimidos, antes das refeições. Insônia → 1 a 2 comprimidos, ao deitar. Depressões nervosas → 1 a 2 comprimidos, 3 vezes ao dia
<i>Passiflora edulis</i>	<i>Sominex</i>	EMS	Comprimidos	<i>Passiflora edulis</i> (50 mg); <i>Valeriana officinalis</i> (40 mg); <i>Crataegus oxyacantha</i> (30 mg)	Distúrbios neurovegetativos → adultos: 2 comprimidos, antes das principais refeições. Crianças maiores de 7 anos: 1 comprimido antes das principais refeições. Depressões nervosas → adultos: 2 a 3 comprimidos ao dia. Crianças maiores de 7 anos: 1 a 2 comprimidos ao dia. Insônia → adultos: 1 comprimido à noite, ao deitar. Crianças maiores de 7 anos: meio comprimido à noite, ao deitar.

Fonte: Bulas dos medicamentos citados, 2014; Autor, 2014.

Neste contexto, o presente trabalho foi centrado na realização de uma investigação química bioguiada, buscando a identificação de substâncias com atividade no sistema nervoso central de espécies do gênero *Passiflora* provenientes da América do Sul, principalmente do Brasil e Colômbia. A razão da ênfase deste trabalho nas espécies da Colômbia decorre da ausência de estudos químicos e farmacológicos e da existência de uma cooperação com um grupo de pesquisa da Universidad Nacional de Colombia (Grupo “Aprovechamiento de

Productos Naturales Mariños y Frutas de Colombia” do Departamento de Química) em andamento desde 2006 com o apoio do CNPq.

As seguintes etapas foram seguidas:

- Obtenção dos extratos aquosos das folhas, pericarpo e/ou polpa das espécies *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *mollissima*;
- Realização da triagem neurofarmacológica dos extratos pelo teste do sono induzido por éter etílico em camundongos visando a identificação dos extratos com maior potencial de ação;
- Análise através de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da composição química dos extratos vegetais utilizados na triagem neurofarmacológica, buscando principalmente identificar os flavonoides presentes.

Uma vez identificada *P. quadrangularis* como a espécie com maior potencial de ação no sistema nervoso central, realizou-se os seguintes passos com os extratos ativos dessa espécie:

- Avaliação das atividades tipo-ansiolítica, tipo-antidepressiva e anticonvulsivante para o extrato aquoso do pericarpo;
- Análise da atividade tipo-ansiolítica para o extrato aquoso das folhas;
- Realização do fracionamento químico bioguiado pela atividade sedativa para os extratos aquosos das folhas e do pericarpo com o intuito de obter frações ou substâncias isoladas com significativa atividade sedativa;
- Investigação dos possíveis mecanismos de ação sedativa dos principais compostos isolados dos extratos.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia e na Central Analítica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, paralelamente ao trabalho doutoral de Geison Modesti Costa (finalizado em 2013 - Programa de Pós-Graduação em Farmácia), que buscava avaliar mais profundamente a composição química dos mesmos extratos. Por fim, buscando investigar os possíveis mecanismos de ação dos compostos isolados, foi realizado um estágio doutoral no Departamento de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Viena (UNIVIE - Áustria), supervisionado pelo Prof. Dr. Steffen Hering. O estágio doutoral teve duração de seis meses (março – agosto de 2013) e

possibilitou a realização dos estudos *in vitro* descritos neste trabalho, além de outros experimentos importantes para projetos em andamento em nosso grupo de pesquisa.

Para a apresentação desse conjunto de resultados, esta tese foi organizada em 3 capítulos.

No capítulo 1 é apresentada uma revisão da literatura acerca dos aspectos etnofarmacológicos, botânicos, químicos e neurofarmacológicos das espécies utilizadas no decorrer do trabalho, sendo elas, *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *mollissima*.

No capítulo 2, após uma breve introdução justificando a investigação das propriedades neurofarmacológicas das espécies de *Passiflora*, foram descritos todos os procedimentos experimentais utilizados e os resultados obtidos com os quatorze extratos vegetais, abrangendo a triagem farmacológica através da avaliação da atividade sedativa e a análise fitoquímica visando a identificação principalmente dos flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ao final deste capítulo foi possível elencar os extratos mais promissores para o aprofundamento da investigação química e neurofarmacológica.

O capítulo 3 contém os dados referentes à investigação química e neurofarmacológica dos extratos escolhidos e o fracionamento bioquímico dos mesmos. Além disso, é mostrada a importância dos flavonoides majoritários na atividade sedativa desses extratos e a influência da via GABAérgica nessa atividade.

Ao final, são apresentadas as considerações finais contendo uma discussão mais ampla do conjunto de resultados, as conclusões e as perspectivas para continuidade de investigação com essas espécies. Após isso, incluiu-se, como anexo, os artigos publicados e as apresentações em congressos e, como apêndice, um quadro apresentando as fórmulas estruturais dos compostos descritos na literatura para as espécies em estudo.

**CAPÍTULO 1. REVISÃO DA
LITERATURA**

Neste capítulo é apresentada uma revisão sucinta da literatura com ênfase nos dados químicos e neurofarmacológicos das espécies de *Passiflora* investigadas: *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *mollissima*. Essa revisão foi realizada até o mês de Junho de 2014 considerando as bases de dados *ScienceDirect*, **Pubmed**, Scielo e *SciFinder*. Também foram incluídos trabalhos anteriores que não estão disponíveis na *internet*, aos quais se teve acesso.

1.1. O GÊNERO *Passiflora*

A maioria das espécies de maracujá que compõe a família *Passifloraceae* originou-se na América tropical (SOUZA; MELETTI, 1997). Estima-se que somente o gênero *Passiflora* possua em torno de 500 espécies, o que o torna o maior gênero da família (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Sob o ponto de vista químico, para as espécies de *Passiflora* é relatada a presença de alcaloides (LUTOMSKI; MALEK, 1975; LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975), saponinas (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985; YOSHIKAWA et al., 2000a,b; REGINATTO et al., 2001, 2004; BIRK et al., 2005; ZUCOLOTTI; PALERMO; SCHENKEL, 2006), glicosídeos cianogênicos (SPENCER; SEIGLER, 1983; SEIGLER et al., 2002), aminoácidos (ICHIMURA et al., 2006) e compostos voláteis (CHASSAGNE et al., 1996; 1998; OSORIO et al., 1999; OSORIO; DUQUE; FUJIMOTO, 2000; OSORIO et al., 2002), os quais serão abordados ainda neste capítulo individualmente para cada espécie estudada. Ainda, segundo a literatura, os constituintes químicos majoritários relatados para as passifloras são os flavonoides, principalmente do tipo C-glicosídeos (ULUBELEN et al., 1982a,b; REHWALD et al., 1994; RAFFAELLI et al., 1997; DE PARIS et al., 2002).

Com relação às atividades farmacológicas de extratos provenientes de espécies de *Passiflora*, são descritas com maior frequência aquelas relacionadas aos efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC) (LOLLI et al., 2007; MALUF et al., 1991; DE PARIS et al., 2002; REGINATTO et al., 2006). Outras atividades observadas são: atividade antioxidante (FERRERES et al., 2007; RUDNICKI et al., 2007a), anti-inflamatória (VARGAS et al., 2007; ZUCOLOTTI et al., 2009), anti-hipertensiva (ICHIMURA et al., 2006), entre outras.

1.2. PASSIFLORAS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Várias espécies de *Passiflora* são utilizadas na medicina popular devido às suas atividades no SNC. Em 1884 já era descrito o uso de espécies de maracujá como calmantes (SCHINDLER, 1884). Posteriormente, Cunha (1941) cita a utilização das folhas e sementes de maracujás como sedativos e cardiotônicos. Segundo Schulz e colaboradores (2001), a Comissão E (30 de Novembro, 1985), por exemplo, também cita a utilização de maracujá como calmante. Além disso, algumas espécies de *Passiflora* têm sido utilizadas para alívio da tensão e da irritabilidade associadas à dificuldade em adormecer (ESCOF, 2003). O uso medicinal de *P. incarnata* para o alívio dos sintomas leves de estresse mental e insônia é descrito em manuais importantes, tais como *Martindale extra Pharmacopoeia, Expanded Commission E monographs*, entre outros (EMEA, 2008). Além de *P. incarnata*, outras espécies de *Passiflora* são incluídas na farmacopeia de seus países como a quinta edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) que traz *P. alata* e *P. edulis* como as espécies oficiais de *Passiflora*.

Os estudos de extratos de *Passiflora* quanto às suas atividades no SNC concentram-se principalmente na espécie *P. incarnata*. Alguns dos trabalhos encontrados na literatura citam que diferentes extratos da espécie, administrados por diferentes vias, apresentam atividade analgésica (SPERONI; MINGHETTI, 1988), anticonvulsivante (ELSAS et al., 2010; SPERONI; MINGHETTI, 1988), tipo-ansiolítica (SAMPATH et al., 2011; SOULIMANI et al., 1997), tipo-ansio gênica (ELSAS et al., 2010), sedativa (SOULIMANI et al., 1997; SPERONI et al., 1996a) e diminuição da atividade locomotora (SOULIMANI et al., 1997; SPERONI; MINGHETTI, 1988) em diferentes testes e linhagens de animais. Ainda, foram encontrados estudos clínicos buscando comprovar as atividades ansiolítica e sedativa de extratos de *P. incarnata* em humanos (MOVAFEGH et al., 2008; NGAN; CONDUIT, 2011). Destacam-se as atividades tipo-ansiolítica e sedativa do extrato aquoso, fração butanólica e fração residual aquosa do pericarpo dos frutos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, em camundongos, administrados por via oral, sendo que a análise cromatográfica desses extratos e frações indicou uma predominância de C-glicosilflavonoides, dos quais foram identificados a isoorientina, a vicenina-2, a spinosina e a 6,8-di-C-glicosilcrisina (SENA et al., 2009). Outros autores descrevem que o

extrato etanólico, o resíduo aquoso, a fração butanólica e algumas subfrações da fração butanólica das partes aéreas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, assim como o flavonoide C-glicosídeo isoorientina também apresentaram atividade tipo-ansiolítica (por via oral) em camundongos (DENG et al., 2010). Além da *P. incarnata* e da *P. edulis* f. *flavicarpa*, outras espécies também foram avaliadas quanto aos seus efeitos neurofarmacológicos. Extratos das folhas de *P. actinia* apresentaram atividade cataléptica, tipo-ansiolítica e sedativa em camundongos (SANTOS; SANTOS; OLIVEIRA, 2005; SANTOS et al., 2006; LOLLI et al., 2007). A atividade sedativa de extratos de *P. caerulea* em camundongos também foi descrita por Speroni e colaboradores (1996b) e as atividades analgésica (SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011), anticonvulsivante (PAVAN et al., 2009) e tipo-antidepressiva (SANTOSH et al., 2011) foram observadas para extratos das folhas de *P. foetida*.

1.3. ESPÉCIES DE PASSIFLORAS DA COLÔMBIA E BRASIL DO PRESENTE ESTUDO

Pérez e colaboradores (2007) mostraram que a região nordeste dos Andes (situada na Colômbia e no Equador) é o centro de diversidade mais importante do gênero *Passiflora*. Dentre as espécies colombianas e brasileiras destacam-se a *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce), a *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* (gulupa na Colômbia e maracujá-roxo no Brasil), a *Passiflora quadrangularis* Linneaus (*badea* na Colômbia e maracujá-açú no Brasil), a *Passiflora tripartita* f. *mollissima* Holm-Nielsen & Møller Jørgensen (*curuba de Castilla* na Colômbia) e a *Passiflora ligularis* Juss. (*granadilla* na Colômbia), devido ao seu uso como alimento. Já, a *Passiflora manicata* Juss. (*curuba-de-monte*) foi incluída neste trabalho devido à sua abundância na Colômbia e falta de estudos sobre a mesma.

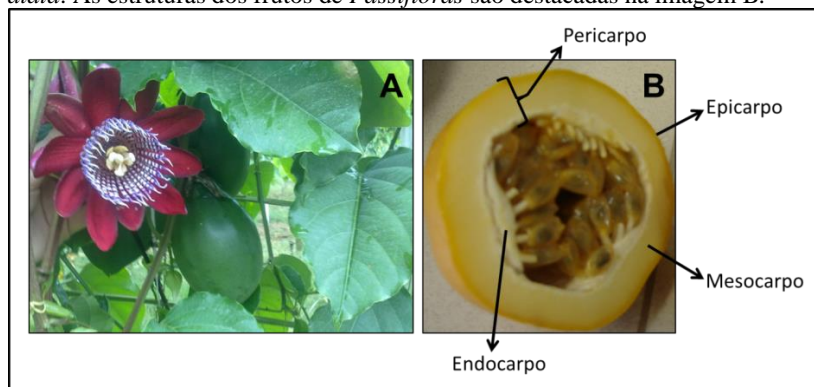
1.3.1. *Passiflora alata* Curtis

A *Passiflora alata* Curtis, popularmente conhecida como maracujá-doce, é uma espécie nativa do Brasil com a distribuição desde o leste do país até o nordeste do Peru (KILLIP, 1938; VANDERPLANK, 2000). A Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010)

descreve que as folhas secas dessa espécie, assim como as da espécie *P. edulis*, são as drogas vegetais do maracujá no Brasil.

As flores de *P. alata* (Fig. 1.1A) apresentam pétalas verdes na face dorsal, carmim na face ventral e aristada no ápice, com corona de coloração vermelha, branca e roxa (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001). Essas características se assemelham muito às das flores de *P. quadrangularis* (Fig. 1.5A) e eventualmente, as duas espécies são confundidas (KILLIP, 1938; VANDERPLANK, 2000). Uma forma de distingui-las é através da corona, a qual na *P. quadrangularis* abre amplamente e na *P. alata* fica estendida como uma cúpula ao redor do ovário (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Quanto aos frutos das duas espécies a distinção é evidente, sendo que a *P. quadrangularis* apresenta frutos grandes e de coloração esverdeada quando maduros (Fig. 1.5B e 1.5C) e os frutos de *P. alata* (Fig. 1.1B) apresentam formato oval (8-10 cm de comprimento e 4-6 cm de diâmetro) e coloração amarela, quando maduros (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001). A polpa dos frutos de *P. alata* é consumida principalmente *in natura* devido ao seu sabor doce-azedo muito apreciado pelos consumidores (JUNQUEIRA et al., 2005).

Figura 1.1: Imagens da flor, folhas e frutos verdes (A) e maduro (B) de *P. alata*. As estruturas dos frutos de *Passifloras* são destacadas na imagem B.



Fotos: Andressa C. Gazola (A) e Fernanda A. Madógllo (B).

1.3.1.1. Composição química descrita para *P. alata*

Na literatura, encontram-se relatos acerca da identificação de flavonoides, saponinas e alcaloides para *P. alata*, os quais são apresentados a seguir e cujas estruturas encontram-se no apêndice A. Praticamente todos os artigos encontrados relatam a presença e/ou o isolamento desses metabolitos secundários em extratos provenientes das folhas da espécie.

1.3.1.1.1. *Flavonoides*

O primeiro relato da presença e isolamento de flavonoides em *P. alata* deu-se para as folhas da espécie, no ano de 1982, por Ulubelen e colaboradores. Nesse artigo, os autores descrevem o isolamento dos flavonoides glicosilados orientina, vitexina-2''-*O*-xilósídeo, vitexina e isovitexina. Dois anos mais tarde, Oga e colaboradores (1984) confirmaram a presença desses dois últimos flavonoides no extrato fluido das folhas preparado de acordo com a Farmacopeia Francesa VIII (1965) e, ainda, quantificaram os flavonoides presentes no extrato, por métodos espectrofotométricos (indicado como 44,8 mg% de flavonoides totais expressos em rutina). Na década passada foi descrita pela primeira vez para a espécie a presença de rutina e isoorientina, além das já conhecidas vitexina e orientina no extrato metanólico das folhas (PEREIRA et al., 2004) e foi feito o isolamento de isovitexina, isoorientina, vitexina-2''-*O*-ramnosídeo, scoparina-2''-*O*-ramnosídeo e orientina-2''-*O*-ramnosídeo do extrato aquoso das folhas (DOYAMA et al., 2005). Recentemente, para as folhas, foi descrita a presença de isoorientina, vitexina e isovitexina nos extratos aquoso, etanólico e metanol:acetona (COLOMEU et al., 2014), além de orientina e vitexina-2''-*O*-ramnosídeo no extrato aquoso (ZUCOLOTTTO et al., 2012) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fotodiodos (CLAE-DAD) e espectroscopia de massas (CLAE-EM). Costa e colaboradores (2013) identificaram ainda que o composto majoritário do extrato aquoso das folhas de *P. alata* é a vitexina-2''-*O*-ramnosídeo. Dessa forma, buscando facilitar a diferenciação entre as espécies *P. alata* e *P. quadrangularis* (que, como comentado acima, apresentam flores e folhas bastante semelhantes), os autores sugerem a utilização dos flavonoides majoritários (que para *P. quadrangularis* é

vitexina-2''-*O*-xilósídeo) como marcadores químicos das espécies (COSTA et al., 2013).

Além de estudos concernentes à composição química das folhas, Zucolotto e colaboradores (2012) descrevem a presença de vitexina-2''-*O*-ramnosídeo no extrato aquoso do pericarpo, sendo que esse foi o primeiro relato na literatura da composição química de outras partes vegetais da espécie.

1.3.1.1.2. Saponinas

Em 2001, Reginatto e colaboradores isolaram do extrato etanólico das folhas de *P. alata* a saponina triterpênica tetracíclica 9,19-ciclolanostano-24 β ,21,26-tri-hidróxi-3,26-di-*O*-gentiobiose. Essa saponina já havia sido previamente relatada para a espécie *P. quadrangularis* e foi por isso denominada quadrangulosídeo (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985). Além do quadrangulosídeo, Reginatto e colaboradores (2001) isolaram ainda a saponina esteroideal 3-*O*- β -d-glicopiranosilestigmasterol e três saponinas triterpênicas de núcleo oleanólico, o ácido 3-*O*- β -d-glicopiranosil-oleanólico, o ácido 3-*O*- β -d-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -d-glicopiranosil-oleanólico e o ácido 3-*O*- β -d-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -d-glicopiranosil-oleanólico. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa realizou a análise quantitativa do extrato aquoso das folhas da espécie por CLAE-UV e verificou que o quadrangulosídeo representa 22,2% (m/m) do extrato e 0,8% (m/m) em relação às folhas secas, constituindo-se assim o composto majoritário para as folhas da espécie (REGINATTO et al., 2004). Outro grupo de pesquisa relatou a presença do quadrangulosídeo e do ácido 3-*O*- β -d-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -d-glicopiranosil-oleanólico no extrato aquoso das folhas da espécie (DOYAMA et al., 2005), compostos esses já observados no extrato etanólico por Reginatto e colaboradores (2001).

1.3.1.1.3. Alcaloides

Relatos acerca da presença de alcaloides no gênero *Passiflora*, especialmente para *P. incarnata*, remontam às décadas de 60 e 70. A grande maioria dos estudos mais recentes detectou somente traços ou total ausência desses metabólitos.

Oga e colaboradores (1984) observaram a presença de alcaloides no extrato fluido das folhas, preparado segundo a Farmacopeia Francesa VIII (1965), e os quantificaram no extrato através de métodos

espectrofotométricos no teor indicado como 0,217 mg%, expressos em harmana. O único estudo mais recente encontrado na literatura que relata a presença de alcaloides na espécie data de 2003. Nele, Abourashed, Vanderplank e Khan identificaram e quantificaram por CLAE (de uma fração enriquecida em alcaloides proveniente do extrato hidrometanólico das folhas) os alcaloides β -carbolínicos harmana, harmalina e harmina na ordem de 0,1 ppm (ou 0,1 $\mu\text{g/g}$) para os dois primeiros e 0,04 ppm para o último.

1.3.1.2. Atividades neurofarmacológicas descritas para *P. alata*

Para *P. alata* já foram relatadas atividade anticonvulsivante, tipo-ansiolítica, sedativa e efeitos sobre a locomoção dos animais, de extratos provenientes das folhas. Até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura para outras partes da planta.

1.3.1.2.1. Atividade anticonvulsivante

Oga e colaboradores (1984) descrevem que o extrato fluido das folhas de *P. alata*, preparado como preconizado pela Farmacopeia Francesa VIII (1965), apresentou atividade anticonvulsivante nas doses de 75 e 150 mg/kg, quando administrado intraperitonealmente (*i.p.*) em camundongos no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

1.3.1.2.2. Atividade tipo-ansiolítica

O extrato aquoso das folhas da espécie apresentou atividade tipo-ansiolítica nas doses de 100 e 150 mg/kg, *i.p.* em ratos (DE PARIS et al., 2002; BARBOSA et al., 2008) no teste do labirinto em cruz elevado. Ainda, a atividade tipo-ansiolítica do extrato aquoso das folhas de *P. alata* secos por nebulização (tipo *spray-drier*), com e sem a adição de excipiente, foi avaliada no teste do labirinto em cruz elevado em ratos. Após a administração oral, tanto o extrato seco (640 mg/kg) quanto o que recebeu adição de excipientes (800 mg/kg) apresentaram atividade tipo-ansiolítica (REGINATTO et al., 2006). Por outro lado, quando o extrato aquoso das folhas foi avaliado no mesmo teste pela via oral (*v.o.*), em camundongos que receberam dose única (300 e 600 mg/kg) ou durante quatorze dias (uma vez ao dia - 2,5; 25 e 250 mg/kg), o

mesmo não se mostrou ativo nas doses administradas (PROVENSI et al., 2008; BRAGA et al., 2013).

O extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata* também foi avaliado no teste do labirinto em cruz elevado. Quando administrado *i.p.* em ratas, esse extrato apresentou atividade tipo-ansiolítica nas doses de 100 e 150 mg/kg (PETRY et al., 2001). Essa mesma atividade foi observada por Provensi e colaboradores (2008), em camundongos, após a administração oral do extrato na dose de 300 mg/kg, a qual foi inibida pelo pré-tratamento com flumazenil. Essa inibição da atividade indica uma correlação positiva entre a atividade tipo-ansiolítica do extrato e a via GABAérgica, já que o flumazenil é um antagonista dos receptores GABAérgicos. Buscando elucidar esse mecanismo de ação, os autores ainda avaliaram o efeito do extrato na ligação do [³H]-flunitrazepam em sinaptossomas oriundos de hemisférios cerebrais de ratos, porém, não foi observada qualquer modificação nessa ligação nas concentrações testadas (PROVENSI et al., 2008).

1.3.1.2.3. Efeitos sobre a memória

Um único estudo avaliou os efeitos do extrato aquoso das folhas de *P. alata* sobre a memória de ratos, após a administração oral nas doses de 25, 50, 100 e 150 mg/kg nos testes de esQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO *step-down* e habituação ao campo aberto. Nessas doses, o extrato não modificou significativamente nenhum dos parâmetros observados nos testes realizados (BARBOSA et al., 2008).

1.3.1.2.4. Efeitos sobre a locomoção

O extrato fluido das folhas de *P. alata*, utilizado por Oga e colaboradores (1984), diminuiu a locomoção dos ratos e ratas tratados *i.p.* na dose de 150 mg/kg quando avaliados no teste de atividade locomotora espontânea, o que poderia indicar uma possível atividade sedativa desse extrato.

Esse mesmo efeito de diminuição da atividade locomotora foi observado para o extrato aquoso das folhas da espécie em tratamento único (600 mg/kg, *v.o.*), porém nenhuma alteração foi observada quando os animais foram tratados com esse extrato por quatorze dias (BRAGA et al., 2013), nem com o extrato hidroetanólico, ambos administrados por via oral a camundongos testados no campo aberto (PROVENSI et al., 2008).

1.3.1.2.5. Atividade sedativa

O primeiro trabalho acerca da atividade sedativa de extratos de *P. alata* foi publicado em 1984. Nele, foi relatada a atividade sedativa do extrato fluido das folhas no teste do sono induzido por pentobarbital após a administração *i.p.* em ratas e ratos nas doses de 75 e 150 mg/kg (OGA et al., 1984).

A atividade sedativa do extrato aquoso das folhas foi observada por Provensi e colaboradores (2008). Nesse artigo os autores relatam que esse extrato, na dose de 300 mg/kg (*v.o.*) diminuiu a latência para o início do sono e aumentou a duração do sono induzido por pentobarbital nos camundongos, atividade não observada após tratamento diário por 14 dias com o extrato (BRAGA et al., 2013).

Além do extrato aquoso, Provensi e colaboradores (2008) relataram que o extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata* também apresenta atividade sedativa em camundongos tratados (*v.o.*), com as doses de 300 e 600 mg/kg, no teste do sono induzido por pentobarbital. Outro grupo de pesquisa também demonstrou a atividade sedativa do extrato hidroetanólico das folhas, porém em outros testes comportamentais. No artigo, os autores relatam que observaram essa atividade nos testes do labirinto em cruz elevado (300 mg/kg), teste do campo aberto (300 mg/kg) e teste de suspensão pela cauda (100 mg/kg), após a administração *i.p.* do extrato em camundongos (ROMANINI et al., 2006). Os autores ainda observaram que a fração residual aquosa também apresenta propriedade sedativa nos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto, nas doses de 300 e 600 mg/kg, e no teste de suspensão pela cauda (100 e 300 mg/kg).

1.3.2. *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*

A *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* é conhecida popularmente como *gulupa* na região andina da Colômbia e maracujá-roxo no Brasil. A espécie ocorre na região amazônica do Brasil e nas encostas da Cordilheira dos Andes, na Colômbia, Equador e Venezuela (BERNAL; DÍAZ, 2005). As flores dessa espécie (Fig. 1.2A) possuem pétalas brancas e corona composta por filamentos roxos na metade inferior e brancos na metade superior. Seus frutos (Fig. 1.2B) são roxo-

amarronzados com comprimento entre 6-7 cm (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001).

Figura 1.2: Imagens da flor, folhas, frutos íntegros (A) e partido (B) de *P. edulis* f. *edulis*.



Fotos: John Ocampo (A) e Paulo Schwirkowski (B).

Primeiramente, é necessário esclarecer que a espécie *P. edulis* é subdividida em duas formas, devido às diferenças morfológicas que ocorrem na natureza. Em 1932, Otto Degener observou que maracujás cujos frutos são amarelos provavelmente originaram-se através de técnicas de melhoramento genético, na Austrália. Essa “nova” forma poderia então ser reconhecida pela cor do fruto, pela porção colorida maior e de arroxeadado mais escuro na coroa, além da presença de glândulas nas sépalas (BERNACCI et al., 2008). Em outras palavras, ele diferenciou essa forma da espécie e a denominou como *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Assim, a forma de frutos de cor púrpura, correspondentes à descrição primária por Sims, recebeu o nome de *Passiflora edulis* f. *edulis*. Até meados dos anos 1990 muitos autores não atentavam para a existência de formas na espécie e, apesar da fácil identificação, não descreviam em seus trabalhos a forma utilizada. Essa confusão trouxe problemas, pois, como é possível verificar em Li e colaboradores (2011), o perfil cromatográfico dos flavonoides presentes em cada forma é bastante distinto, o que provavelmente favorece as diferentes atividades observadas para a espécie nas mesmas doses avaliadas. Diante do exposto, apenas os trabalhos que claramente identificaram o material vegetal como proveniente de *P. edulis* f. *edulis* serão descritos adiante tendo em vista que foi essa a forma utilizada neste estudo.

1.3.2.1. Composição química descrita para *P. edulis* f. *edulis*

A composição química de *P. edulis* f. *edulis* vem sendo investigada desde 1991. Nos trabalhos encontrados na literatura, é descrita a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos, além de compostos voláteis e aminoácidos nos frutos e/ou folhas da espécie.

1.3.2.1.1. Flavonoides e outros compostos fenólicos

A análise cromatográfica por CLAE-DAD do extrato aquoso das folhas de *P. edulis* f. *edulis* mostrou a presença de flavonoides, porém não foi possível identificá-los (Zucolotto et al., 2012). Recentemente, foram isolados do extrato 70% acetona/água das folhas e caules quatro flavonas inéditas, sendo elas: luteolina-8-*C*- β -digitoxipiranosil-4'-*O*- β -d-glicopiranosídeo, apigenina-8-*C*- β -digitoxipiranosídeo, apigenina-8-*C*- β -boivinopiranosídeo e luteolina-8-*C*- β -boivinopiranosídeo, juntamente com outras cinco flavonas já conhecidas: luteolina-8-*C*- β -digitoxipiranosil-4'-*O*- β -d-glicopiranosídeo, apigenina-8-*C*- β -digitoxipiranosídeo, apigenina-8-*C*- β -boivinopiranosídeo, luteolina-8-*C*- β -boivinopiranosídeo e luteolina-8-*C*- β -digitoxipiranosídeo (XU et al., 2013).

Para o extrato aquoso do pericarpo, foi descrita a presença de ácido protocatéquico, catequina, epicatequina, canferol, canferol-3-*O*-glicosídeo, luteolina-8-*C*-neohesperosídeo, luteolina-8-*C*-digitoxosídeo, prunasina, quercetina, cianidina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-glicosídeo e ácido edulílico, por CLAE-DAD, sendo esses três últimos os compostos majoritários (ZIBADI et al., 2007). A análise quantitativa por cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas (CL-EM) demonstrou que o extrato metanólico do pericarpo da espécie contém 20 μ g de luteolina e 41 μ g de luteolina-6-*C*-glicosídeo (isoorientina) por grama de extrato seco (ICHIMURA et al., 2006).

1.3.2.1.2. Compostos voláteis

Os compostos voláteis têm sido sistematicamente investigados por determinarem o odor do extrato.

Em 1991, Herderich e Winterhalter relataram a presença de 3-hidroxi-retro- α -ionol na polpa de *P. edulis* f. *edulis* através de

cromatografia gasosa capilar acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM). Esse composto, segundo os autores, é facilmente convertido em compostos isoméricos responsáveis pelo aroma da polpa em meio ácido. Posteriormente, um grupo de pesquisa da França publicou três artigos que descrevem a presença de compostos voláteis também na polpa da espécie. Chassagne e colaboradores (1996) relataram o isolamento de três precursores de compostos voláteis identificados como 6-*O*- α -l-arabinopiranosil- β -d-glicopiranosídeo de linalool, álcool benzílico e 3-metil-but-2-en-1-ol. No segundo trabalho do grupo é descrita a presença e a quantificação por CG-EM de mais de 10 compostos voláteis glicosilados (CHASSAGNE et al., 1998). Por fim, os mesmos autores descrevem a quantificação de mais de quarenta compostos voláteis formados após a hidrólise enzimática dos glicosídeos presentes na polpa da espécie, sendo eles compostos hidroxilados, terpênicos, norisoprenoides e aromáticos (CHASSAGNE; BOULANDER; CROUZET, 1999).

1.3.2.1.3. Aminoácidos

Ichimura e colaboradores (2006) relataram a presença de GABA no extrato metanólico do pericarpo de *P. edulis* f. *edulis*. Esse aminoácido foi quantificado por CL-EM e por um aparelho analisador de aminoácidos (Hitachi L-8500A) onde os resultados encontrados foram de 2,4 mg e 4,4 mg de GABA por grama de extrato seco, respectivamente.

1.3.2.2. Atividades neurofarmacológicas descritas para *P. edulis* f. *edulis*

Foi encontrado apenas um trabalho acerca de atividades no SNC de extratos de *P. edulis* f. *edulis*. Nele, é descrita a atividade sedativa dos extratos hidroetanólicos das folhas de quatro diferentes materiais vegetais, observada após a administração oral em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado (LI et al., 2011).

1.3.3. *Passiflora ligularis* Juss.

A *P. ligularis* Juss. é nativa e cultivada na Venezuela, Peru e Bolívia em altitudes superiores a 1.000 metros (ASTURIZAGA;

OLLGAARD; BALSLEV, 2006). Essa espécie, conhecida popularmente como *granadilla*, apresenta flores com pétalas brancas (Fig. 1.3A). Os frutos (Fig. 1.3B e C), amarelos quando maduros, apresentam formato oval (6-8 cm de comprimento e 4-5 cm de diâmetro), cuja casca é bastante rígida. A polpa tem sabor doce, o que favorece o consumo da fruta na forma fresca (PIO CORRÊA, 1978; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; ARBELAEZ, 1996; ASTURIZAGA; OLLGAARD; BALSLEV, 2006).

Figura 1.3: Imagens das folhas, flor (A), frutos íntegros (B) e partidos (C) de *P. ligularis*.



Fotos: Silvana M. Zucolotto Langassner.

Para essa espécie não foram encontrados na literatura artigos referentes às suas atividades neurofarmacológicas.

1.3.3.1. Composição química descrita para *P. ligularis*

Foram encontrados na literatura três trabalhos relacionados com a investigação química de *P. ligularis*. Neles é relatada a presença de flavonoides nas folhas e no pericarpo, compostos voláteis na polpa e açúcar no pericarpo.

1.3.3.1.1. *Flavonoides*

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato aquoso das folhas e do pericarpo da espécie indica manchas com características de flavonoides tipo C-glicosídeos (Zucolotto et al., 2012).

1.3.3.1.2. *Compostos voláteis*

Chassagne e colaboradores (1998) relataram a presença e quantificação por CG-EM de nove glicosídeos voláteis na polpa da espécie. Posteriormente, os autores realizaram hidrólise enzimática dos glicosídeos presentes na polpa e quantificaram as treze substâncias formadas (compostos hidroxilados, norisoprenoides e aromáticos) (CHASSAGNE; BOULANDER; CROUZET, 1999).

1.3.4. *Passiflora manicata* Juss.

A *P. manicata* Juss. é conhecida popularmente como *curuba-de-monte*, *tauso* e *diablito*. Essa última denominação possivelmente está associada aos relatos de toxicidade existentes para essa espécie (BERNAL; DÍAZ, 2005). A *P. manicata* ocorre predominantemente em altitudes elevadas (de 1.500 a 2.600 metros) e é a única espécie do subgênero *manicata* (BERNAL; DÍAZ, 2005). Suas flores (Fig. 1.4) apresentam pétalas vermelhas e seus frutos, de coloração verde quando maduros, são pequenos (3 a 3,6 cm de largura) e escassos de polpa (ESCOBAR, 1988), o que impossibilita seu uso como alimento.

Figura 1.4: Imagem das folhas, flor e fruto (em destaque) de *P. manicata*.



Foto: Galeria de fotos da Biblioteca “Luiz Ángel Arango” (Colômbia)/www.lablaa.org

Assim como para *P. ligularis*, não são conhecidos trabalhos científicos sobre as atividades neurofarmacológicas de extratos dessa espécie.

1.3.4.1. Composição química descrita para *P. manicata*

Até o presente momento foram encontrados estudos relacionados apenas à composição química das folhas da espécie, muito provavelmente porque os frutos não são consumidos. Os dois trabalhos encontrados relatam a presença de flavonoides C-glicosilados em diferentes extratos.

1.3.4.1.1. Flavonoides

Abourashed, Vanderplank e Khan (2002) relataram a presença dos flavonoides C-glicosídeos isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina no extrato hidrometanólico das folhas da espécie em análise por CLAE-DAD. Outro grupo de pesquisa analisou o extrato aquoso das folhas da espécie por CLAE-DAD e CLAE-EM e descreveu a presença

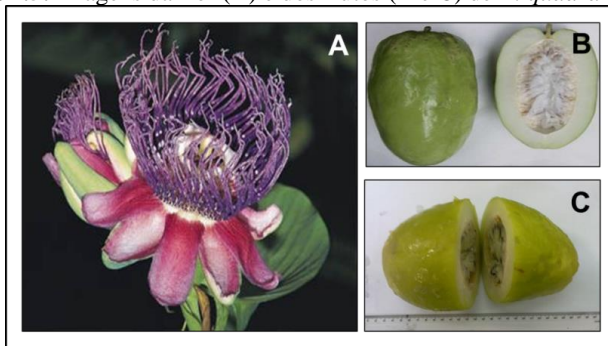
dos mesmos flavonoides encontrados previamente, além de vitexina-2''-*O*-ramnosídeo. Cabe salientar que a isovitexina foi encontrada como sendo o flavonoide majoritário do extrato, enquanto a vitexina-2''-*O*-ramnosídeo é o minoritário (ZUCOLOTTO et al., 2012; MORRONE et al., 2013).

1.3.5. *Passiflora quadrangularis* Linneaus

A *Passiflora quadrangularis* L. é cultivada por toda a América tropical em altitudes inferiores a 2.500 metros (KILLIP, 1938). No Brasil é descrita a ocorrência da espécie nos estados do Amazonas e Maranhão (CERVI, 1997) e, na Colômbia, nas regiões de Chocó, Meta, Huila e Santander.

Conhecida popularmente como maracujá-açu no Brasil (CERVI, 1997) e *badea* na Colômbia (HERNÁNDEZ; BERNAL, 2000), essa espécie apresenta flores (Fig. 1.5A) cujas pétalas são brancas com manchas rosa, e a corona é formada por uma série de elementos filamentosos de coloração roxo-avermelhada e branca na parte inferior, azul no meio e azul-rosada na parte superior (ARBELAEZ, 1996; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Os frutos (Fig. 1.5B e C) são extremamente grandes (20-30 cm de comprimento x 12-15 cm de largura, peso 1,5-3 kg), quando comparados aos demais frutos de espécies de *Passiflora* (BERNAL; DÍAZ, 2005) e apresentam coloração verde amarelada quando maduros (MARTIN; NAKASONE, 1970).

Figura 1.5: Imagens da flor (A) e dos frutos (B e C) de *P. quadrangularis*.



Fotos: Galeria de Fotos da Biblioteca “Luiz Ángel Arango” (Colômbia)/www.lablaa.org (A); Silvana M. Zucolotto Langassner (B) e Andressa C. Gazola (C).

1.3.5.1. Composição química descrita para *P. quadrangularis*

A composição química de *P. quadrangularis* vem sendo estudada desde 1985, quando foi relatada a presença de saponinas nas folhas da espécie. Foram identificados alguns dos compostos responsáveis pelo odor da polpa e mais recentemente foi descrita a presença de flavonoides nas folhas.

1.3.5.1.1. Flavonoides

O primeiro relato acerca da presença de flavonoides em *P. quadrangularis* é bastante recente. Zucolotto e colaboradores (2012) identificaram, em análise por CLAE-DAD e CLAE-EM no extrato aquoso das folhas da espécie, a vitexina-2''-*O*-ramnosídeo como composto minoritário. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa relata que o composto majoritário desse extrato é a vitexina-2''-*O*-xilósídeo, tendo sido quantificado por CLAE-DAD (29,16 mg/g do extrato) (COSTA et al., 2013).

1.3.5.1.2. Saponinas

A presença de saponinas em diversas espécies de *Passiflora* é relatada. Para o extrato metanólico das folhas de *P. quadrangularis* foram isoladas as saponinas quadrangulosídeo (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985), 9,19-ciclolanostano-22,25-epoxi-3 β -21,22(R)-triol-3 β -*O*-gentiobiosídeo, 9,19-ciclolanostano-21,24-epoxi-3 β -25,26-triol-3 β -*O*-gentiobiosídeo e o ácido oleanólico-3-soforosídeo (ORSINI et al., 1987).

1.3.5.1.3. Compostos voláteis

Da polpa de *P. quadrangularis* foram isolados terpenos responsáveis pelo odor. Esses terpenos foram identificados como (3*E*)-3,7-dimetil-3-octano-1,2,6,7-tetraol (OSORIO et al., 1999); ácido (2*E*)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico; éster do ácido (2*E*)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico- β -d-glicopiranosil; (5*E*)-2,6-dimetil-5,7-octadieno-2,3-diol; (3*E*)-3,7-dimetil-3-octano-1,2,6,7-tetraol; 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona- β -d-glicopiranosídeo (OSORIO; DUQUE; FUJIMOTO,

2000). Além desses, o mesmo grupo de pesquisa identificou, por cromatografia gasosa capilar (CGC) e CG-EM, compostos voláteis livres, ligados a glicosídeos e ligados a fosfatos. Foram observados 57 compostos voláteis livres, sendo os majoritários (5*E*)-2,6-dimetil-5,7-octadien-2,3-diol, ácido (2*E*)-2,6-dimetil-2,5-heptadienóico, ácido benzoico, furaneol, álcool benzílico, 2,6-dimetil-5-hepten-1-ol, ácido dimetilheptadienoico e 2,6-dimetilheptenol. Os autores ainda destacam que três desses compostos, (*E*)-2-pentenol; 2,6-dimetil-5-hepten-1-ol e ácido (2*E*)-2,6-dimetil-2,5-heptadienóico são os principais responsáveis pelo aroma do fruto fresco juntamente com outros compostos gerados após a hidrólise enzimática dos compostos glicosilados e fosfatados (OSORIO et al., 2002).

1.3.5.2. Atividades neurofarmacológicas descritas para *P. quadrangularis*

Para a espécie *P. quadrangularis* foi encontrado apenas um trabalho acerca dos efeitos de extratos da espécie no SNC de animais. Nesse trabalho os autores avaliaram as atividades tipo-ansiolítica e os efeitos na locomoção dos animais tratados com o extrato aquoso e hidroetanólico das folhas.

1.3.5.2.1. Atividade tipo-ansiolítica

A atividade tipo-ansiolítica do extrato hidroetanólico das folhas de *P. quadrangularis* por via oral foi observado em ratos avaliados nos testes do labirinto em cruz elevado (500 mg/kg), campo aberto (100, 250 e 500 mg/kg) e placa perfurada (250 mg/kg). Esse efeito não foi observado para o extrato aquoso (CASTRO et al., 2007).

1.3.5.2.2. Efeito sobre a locomoção

Da mesma forma que ocorreu na avaliação da atividade tipo-ansiolítica, o extrato aquoso das folhas não apresentou atividade no teste do campo aberto. Por outro lado, o extrato hidroetanólico causou aumento da ambulação dos ratos tratados (*v.o.*) na dose de 100 mg/kg, demonstrando um possível efeito neuroestimulante (CASTRO et al., 2007).

1.3.6. *Passiflora tripartita* f. *mollissima* Holm-Nielsen & Møller Jørgensen

A *P. tripartita* f. *mollissima* Holm-Nielsen & Møller Jørgensen, conhecida popularmente como *curuba de castilla* na Colômbia, era cientificamente denominada *P. mollissima* (Kunth) Bailey (PRIMOT et al., 2005). Essa espécie é cultivada em altitudes entre 2.000-3.630 metros na região que compreende desde a Venezuela ao leste da Colômbia até a Bolívia e o Peru. As flores (Fig. 1.6A) são tubulosas, com pétalas de coloração rosa e os frutos (Fig. 1.6B e C) oblongos e ovoides (até 12 cm) (ESCOBAR, 1988; RAMÍREZ; GONZÁLEZ, 1997; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; ASTURIZAGA; OLLGAARD; BALSLEV, 2006; VASCO; RUEALES; KAMAL-ELDIN, 2008) assemelham-se a uma banana, vindo daí o nome *banana passion fruit* utilizado em países como Austrália e Nova Zelândia (WILLIAMS; BUXTON, 1995).

Figura 1.6: Imagens das flores, folhas (A) e frutos (B e C) de *P. tripartita* f. *mollissima*.



Fotos: Silvana M. Zucolotto Langassner.

As folhas dessa espécie são utilizadas para a produção de medicamentos fitoterápicos comercializados na Colômbia como sedativos e calmantes. Apesar desses medicamentos serem aprovados

pelo órgão responsável pela vigilância de medicamentos naquele país (Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos y Alimentos - INVIMA) (INVIMA, 1997; 2004), não foram encontrados na literatura científica quaisquer estudos que comprovassem as propriedades terapêuticas no SNC para essa espécie.

1.3.6.1. Composição química descrita para *P. tripartita* f. *mollissima*

Foi possível encontrar na literatura trabalhos que verificaram a presença de flavonoides C-glicosídeos nas folhas e no pericarpo de *P. tripartita* f. *mollissima* e de compostos voláteis na polpa da espécie, os quais são responsáveis pelo aroma da mesma.

1.3.6.1.1. Flavonoides

O primeiro relato sobre flavonoides C-glicosilados em *P. mollissima* (antiga denominação de *P. tripartita* f. *mollissima*) foi realizado em 2002 por Abourashed, Vanderplank e Khan. Em seu trabalho, os autores verificaram a presença de isovitexina no extrato hidrometanólico das folhas através de análise por CLAE-DAD. Um derivado da orientina, identificado como 4'-*O*-metil-luteolina-8-*C*-6''-acetilglicopiranosídeo foi descrito para o extrato etanólico das folhas (RAMOS et al., 2010). Outro estudo relata a presença de orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, swertisina e vicianina-2 no extrato aquoso das folhas analisado por CLAE-DAD e CLAE-EM (ZUCOLOTTO et al., 2012).

Ainda, Zucolotto e colaboradores (2012) descreveram a presença de isoorientina, orientina e isovitexina no extrato aquoso do pericarpo utilizando CLAE-DAD e CLAE-EM. Outro grupo de pesquisa identificou também através de análises por CLAE-DAD e CLAE-EM, a presença de 7-*O*-glicosil-isoschaftosídeo, schaftosídeo, vicianina II, luteolina-7-*O*-glicopiranosil-8-*C*-(6''acetil)-glicopiranosídeo, orientina, apigenina-5-*O*- β -d-glicopiranosil-8-*C*-(6''acetil)- β -d-glicopiranosídeo, 4'-metil-luteolina-8-*C*- β -d-glicopiranosídeo, luteolina-8-*C*-(6''acetil)- β -d-glicopiranosídeo e 4'-metil-luteolina-8-*C*-(6''acetil)- β -d-glicopiranosídeo nos extratos metanol:água (7:3, v/v) do pericarpo e da polpa com sementes da espécie além de orientina-7'''-*O*-glicosídeo, leucenina II, isoschaftosídeo, leucenina II-4'-metil éter, vitexina,

eriodictiol-6,8-di-*C*-glicosídeo, miricetina, miricetina-3-*O*-(6''-galoil)-glicosídeo, miricetina-3'-*O*-metil éter e apigenina-8-*C*-(6''acetil)- β -d-glicopiranosídeo no extrato do pericarpo (SIMIRGIOTIS et al., 2013).

1.3.6.1.2. Compostos voláteis

Na década de 80, um grupo de pesquisa da Colômbia identificou na polpa da espécie 140 compostos voláteis por CGC e CG-EM (FROEHLICH; DUQUE; SCHREIER, 1989). Já, em 1998, outro grupo de pesquisa, relatou a presença e quantificação por CG-EM dos β -d-glicopiranosídeos de hexanol (3,8 mg/kg), álcool benzílico (0,2 mg/kg), 2-feniletanol (0,9 mg/kg), nerol (0,5 mg/kg), geraniol (traços) e eugenol (2,9 mg/kg) também na polpa (CHASSAGNE et al., 1998). Esses autores realizaram ainda a hidrólise enzimática dos glicosídeos presentes e quantificaram dezoito compostos hidroxilados, terpenoides, norisoprenoides ou aromáticos formados (CHASSAGNE; BOULANDER; CROUZET, 1999).

**CAPÍTULO 2. ANÁLISES
CROMATOGRÁFICAS E TRIAGEM
NEUROFARMACOLÓGICA DOS
EXTRATOS DAS ESPÉCIES DE
*Passiflora***

2.1. INTRODUÇÃO

Os estudos acerca da composição química e atividades farmacológicas de espécies do gênero *Passiflora* vêm sendo investigados neste programa de pós-graduação em parceria com outros grupos de pesquisa na última década. Nos estudos anteriores deu-se destaque preferencial às duas espécies mais utilizadas no Brasil, sendo elas a *P. alata* (MADÓGLIO, 2011) e a *P. edulis* f. *flavicarpa* (LANGASSNER; 2009; SENA, 2009). Além dessas espécies, iniciou-se a investigação química de passifloras de ocorrência na América do Sul, como no caso de *P. bogotensis*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *molíssima* (LANGASSNER, 2009; COSTA, 2013). No presente estudo objetivou-se a investigação química e neurofarmacológica das espécies *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *molíssima* visando identificar compostos e frações ativas. Neste capítulo serão abordados os métodos e os resultados da: 1) triagem farmacológica realizada a partir da avaliação da atividade sedativa no teste do sono induzido por éter etílico e 2) análise fitoquímica visando identificar principalmente os flavonoides presentes nos extratos.

A avaliação da atividade sedativa para realização da triagem farmacológica dos extratos de *Passiflora* foi escolhida porque as folhas de várias espécies do gênero são utilizadas popularmente como calmantes e sedativas (SCHINDLER, 1884; CUNHA, 1941; PIO CORRÊA, 1978; BLUMENTHAL, 1998).

Com relação à centralização da análise cromatográfica em flavonoides, muitos trabalhos sugerem que esses são os principais constituintes químicos responsáveis pelas atividades no SNC de espécies vegetais, incluindo algumas do gênero *Passiflora* (SENA et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; CHOW et al., 2011).

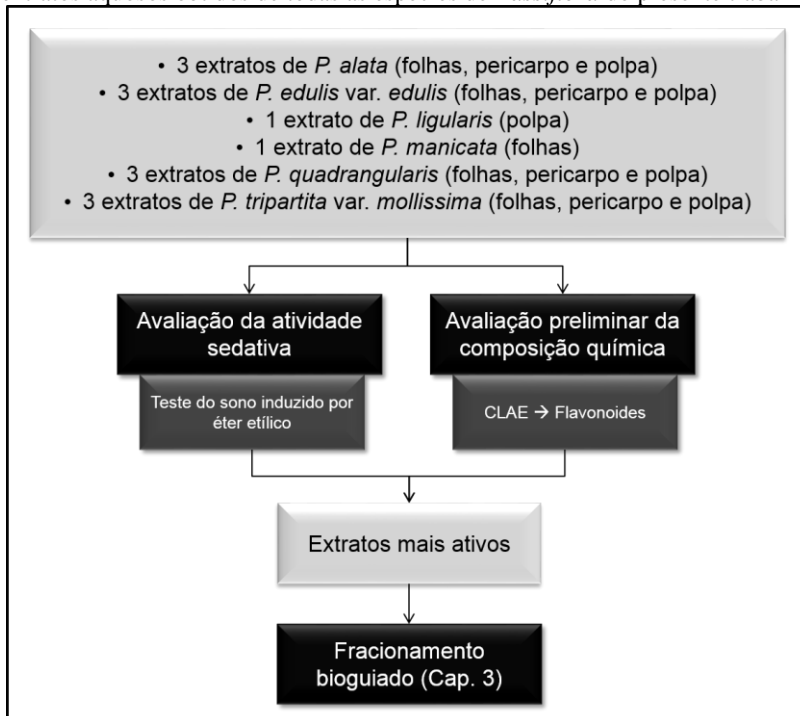
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem neurofarmacológica dos extratos pelo teste do sono induzido por éter etílico em camundongos visando identificar os extratos com maior potencialidade de atividade;

- Analisar, com técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a composição química dos extratos vegetais utilizados na triagem neurofarmacológica, buscando principalmente a identificação dos flavonoides presentes.

Para alcançar esses objetivos, foi utilizada a abordagem apresentada de forma esquemática na figura 2.1.

Figura 2.1: Esquema representativo da abordagem utilizada na triagem neurofarmacológica e na avaliação da composição química realizada com os extratos aquosos obtidos de todas as espécies de *Passiflora* do presente trabalho.



CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Cap. 3 = Capítulo 3.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Materiais vegetais

Os materiais vegetais (folhas e frutos) das espécies de *Passiflora* presentes neste trabalho, bem como seus locais de coleta, pessoa responsável pela identificação e número de depósito da exsicata estão relacionados no quadro 2.1.

Quadro 2.1: Dados referentes à coleta dos materiais vegetais das espécies de *Passiflora* do presente trabalho.

Espécie	Local da coleta	Identificação/exsicata
<i>P. alata</i> Curtis	Urussanga, Santa Catarina – Brasil (-28°32'9", - 49°18'59")	Sr. Ademar Brancher (EPAGRI/Urussanga-SC)/Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 37823)
<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>	Santa Sofia, Boyacá – Colômbia (05°43'01", - 73°36'20")	Prof. Luis Carlos Jimenez/Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL 530661)
<i>P. ligularis</i> Juss.	Bogotá, Cundinamarca – Colômbia (4°35'60", - 4°4'60")	Prof. Luis Carlos Jimenez/Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL 530660),
<i>P. manicata</i> Juss.	Villa de Leywa, Boyacá – Colômbia (5°38'0", - 73°32'0")	Prof. Luis Carlos Jimenez/Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL 530663),
<i>P. quadrangularis</i> Linneaus	Neiva, Huila – Colômbia (2°59'55", - 75°18'16")	Prof. Luis Carlos Jimenez/Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL 572634)
<i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> Holm-Nielsen & Møller Jørgensen	Santa Sofia, Boyacá – Colômbia (05°43'01", - 73°36'20")	Prof. Luis Carlos Jimenez/Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL 530663)

2.3.1.1. Obtenção dos extratos vegetais

As folhas das diferentes espécies foram secas em estufa de ar circulante (temperatura inferior à 40°C), moídas em moinho de facas e extraídas por infusão aquosa, na proporção planta:solvente de 1:10 (m/v) a 90 °C, durante 10 min. Após o arrefecimento, os extratos foram filtrados e liofilizados.

Os frutos frescos das diferentes espécies tiveram suas polpas removidas e trituradas em liquidificador. Após esse procedimento, os extratos da polpa foram filtrados e liofilizados.

Já o pericarpo *in natura* foi cortado em pequenas partes, extraído por infusão aquosa, na proporção pericarpo:solvente de 1:3 (m/v) a 90 °C, durante 10 min. Após o arrefecimento, os extratos foram filtrados e liofilizados.

2.3.2. Solventes, reagentes, fármacos e outros materiais utilizados

- Metanol P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Cromatoplasacas de gel de sílica 60F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Düren, Zúrique);
- Acetato de etila P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Acetona P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Ácido acético P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- 2-aminoetil difenilborinato (Fluka®, Buchs, Suíça). Utilizado no preparo do reagente natural (solução metanólica 1%);
- *p*-anissaldeído (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Utilizado no preparo do anissaldeído sulfúrico (Solução obtida após dissolução de 0,5 g de anissaldeído em 100 ml de metanol com posterior adição de 4 ml de ácido clorídrico e 5 ml de ácido sulfúrico);
- Metanol HPLC (Tedia®, RJ, Brasil);
- Acetonitrila HPLC (Tedia®, RJ, Brasil);
- Ácido fórmico HPLC (Tedia®, RJ, Brasil);
- 6,8-di-C-glicosil-crisina (cedida pelo Dr Norberto Peporine Lopes, isolada das folhas de *Lychnophora ericoides*);
- Isoorientina (Extrasynthèse®, Genay, França);
- Isovitexina (Fluka®, Buchs, Suíça);
- Vitexina-2''-O-xilosídeo (isolada das folhas de *Passiflora quadrangularis*);
- Swertisina (isolada das raízes de *Wilbrandia ebracteata*);

- Vitexina-2''-O-ramnosídeo (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA);
- Apigenina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA);
- Éter etílico (Lafan Química Fina Ltda., Várzea Paulista, SP, Brasil);
- Diazepam, solução injetável (Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brasil), diluída em água destilada.

2.3.3. Análise cromatográfica dos extratos

Após a obtenção dos extratos vegetais de cada espécie, os mesmos foram cromatografados por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), buscando-se identificar os compostos químicos presentes. Visaram-se principalmente os flavonoides, já que compostos dessa classe são frequentemente encontrados em espécies de *Passiflora*.

2.3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As amostras, solubilizadas em metanol, foram aplicadas com auxílio de capilar em placas pré-confeccionadas de gel de sílica 60F₂₅₄ (Macherey-Nagel®). O eluente utilizado foi acetato de etila:acetona:ácido acético:água (8:2:1:1, v/v/v/v), que permite a visualização de flavonoides C-glicosídeos. As placas foram reveladas com reagente natural A (difenilboriloxietilamina 1% em metanol), o qual quando observado sob luz UV 365 nm confere fluorescência aos flavonoides. Após a visualização dos flavonoides, as mesmas placas foram borrifadas com anisaldeído sulfúrico e aquecidas com pistola de ar quente para revelar compostos com características de saponinas e também de açúcares.

2.3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas à temperatura ambiente (21 ± 2°C) em um equipamento Perkin Elmer 200 equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD – 200 a 400 nm), bomba quaternária, *degasser on-line* e injetor automático. Como fase fixa foi utilizada coluna analítica Perkin Elmer Brownlee C₁₈ com diâmetro

interno de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. O volume de injeção foi de 20 µl de cada amostra previamente solubilizadas em metanol:água (1:1, v/v). As fases móveis (descritas abaixo) foram preparadas diariamente e desgaseificadas ao vácuo por ultrassom (10 min) previamente ao uso. Os cromatogramas foram monitorados a 340 nm. Os dados foram processados no *software* Chromera® (Versão 3.2.0.4847).

Os parâmetros acima foram utilizados em todas as análises, porém outros foram diferenciados, conforme descrito abaixo:

2.3.3.2.1. Análise de flavonoides glicosilados

A concentração dos extratos analisados foi 5 mg/ml e das frações foi 1 mg/ml. Foi empregado gradiente linear de acetonitrila (solvente A) e ácido fórmico 0,5% em água (solvente B): 0 - 15 min, 15% - 35% A. Os padrões utilizados foram os flavonoides glicosilados: 6,8-di-C-glicosil-crisina, isoorientina, isovitexina, vitexina-2''-O-xilosídeo, swertisina e vitexina-2''-O-ramnosídeo.

2.3.3.2.2. Análise das agliconas de flavonoides

O sistema de gradiente utilizado para a análise das agliconas de flavonoides foi: gradiente linear de acetonitrila (solvente A) e ácido fórmico 0,5% em água (solvente B): 0 - 20 min, 15% - 35% A e 20 - 25 min, isocrático 35% A. A concentração dos extratos vegetais nas soluções aplicadas foram: 2 mg/ml dos extratos aquosos das folhas das espécies e 5 mg/ml dos extratos aquosos da polpa e do pericarpo. O flavonoide utilizado como padrão foi a apigenina.

Para a análise quantitativa de apigenina nos extratos utilizou-se o método de padrão externo, no qual, a apigenina foi utilizada como composto referência para a confecção da curva e calibração com seis pontos que variaram de 0,5 - 40 µg/ml. Todas as soluções foram analisadas em triplicata e as médias das áreas sobre a curva foram medidas e calculadas. A validação dos procedimentos analíticos foi realizada de acordo com o que prescrevem as diretrizes ICH (2005).

2.3.4. Avaliação das atividades neurofarmacológicas

2.3.4.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos machos adultos (12 a 16 semanas) pesando entre 35 e 50 g, mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro/escuro de 12 h, com luzes acendendo às 7h00, e temperatura de 22 ± 2 °C. Os animais foram mantidos em caixas-moradia (30 x 37 x 16 cm) em número de 20 a 30 por caixa, com livre acesso a água e alimento, exceto durante as sessões teste. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia até sua transferência para o Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, uma semana antes dos experimentos, no mínimo. No dia dos experimentos os animais foram alocados na sala de experimentos no mínimo 1 h antes do início do teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas nacionais e internacionais de bem-estar animal (Lei nº 11.794, de 08.10.2008) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta universidade (#23080.044085/2009-37/CEUA/UFSC). O número mínimo de animais e de duração dos testes requeridos para obter resultados consistentes foram empregados.

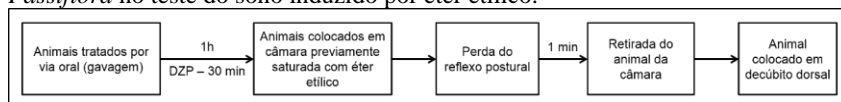
2.3.4.2. Avaliação da atividade sedativa

Levando-se em consideração que chás das folhas e sucos dos frutos de espécies de *Passiflora* são utilizados popularmente como sedativos, essa foi a atividade que guiou a triagem neurofarmacológica dos extratos utilizados neste trabalho.

2.3.4.2.1. *Teste do sono induzido por éter etílico*

O delineamento experimental deste teste está representado esquematicamente na figura 2.2.

Figura 2.2: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos das folhas, do pericarpo e/ou da polpa das espécies de *Passiflora* no teste do sono induzido por éter etílico.



DZP = diazepam.

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com os extratos aquosos das folhas, pericarpo e/ou polpa de *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *molíssima*. Inicialmente todos os extratos foram administrados nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg, doses essas escolhidas no estudo prévio do grupo de pesquisa (Sena et al., 2009). Após o teste com as três doses supracitadas, observou-se necessidade de ajuste de dose para os extratos das folhas de *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *molíssima*, os quais também foram avaliados nas doses de 30 e/ou 60 mg/kg. Uma hora após o tratamento, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de vidro redonda transparente (20 x 15 cm) saturada com éter etílico (6 ml, 13 min para saturação). A saturação da cuba ocorreu pelo umedecimento de duas bolas de algodão (massa aproximada de 3 g) com 3 ml de éter etílico, cada uma, colocadas no fundo e no teto da câmara (VIEIRA, 2001, adaptado). O seguinte parâmetro foi observado: tempo total de duração do sono (em segundos). O início do sono foi considerado a partir da perda do reflexo postural, terminando com a recuperação deste reflexo. Após a perda do reflexo postural, esperou-se 1 min para retirada de cada animal da câmara e, em seguida, cada animal foi colocado em decúbito dorsal para registro do tempo total de sono. Como controle positivo, foi utilizado diazepam na dose de 1 mg/kg administrado 30 min antes do teste e como controle foi utilizada água destilada (1h antes do teste), ambos administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

2.3.4.1. Análise estatística

Os dados paramétricos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas dos grupos tratados com o controle foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida do teste *post-hoc* de Dunnett. Entre os grupos controle e controle positivo foi realizado o teste *t* de Student não pareado. A probabilidade aceita como existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p \leq 0,05$ e o indicativo de tendência à atividade foi $0,1 < p < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa estatístico Prisma GraphPad® 5.0 e/ou Statistica® 7.0. Os *outliers* foram retirados do resultado final após

serem reconhecidos no teste de Grubbs (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*¹).

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Triagem neurofarmacológica

Devido ao elevado número de extratos obtidos² (14 extratos) foi inicialmente realizada uma triagem neurofarmacológica com o intuito de selecionar extratos com maior potencialidade de ação neurofarmacológica. Para a escolha do teste levou-se em consideração a necessidade de uma metodologia fácil e rápida que garantisse resultados confiáveis. Assim, avaliou-se a atividade sedativa dos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. alata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* f. *mollissima*, além dos extratos aquosos da polpa de *P. ligularis* e das folhas de *P. manicata* através do teste do sono induzido por éter etílico.

O método mais empregado para avaliação da atividade sedativa é o teste do sono induzido por pentobarbital sódico. Entretanto, neste trabalho optou-se pela utilização do éter etílico para iniciar o sono nos camundongos tendo em vista que os barbitúricos normalmente são indutores do citocromo P450 hepático e das enzimas de conjugação, e que quaisquer outras substâncias metabolizadas pelo sistema citocromo P450 podem interagir farmacocineticamente, alterando os resultados obtidos (VIEIRA, 2001). Portanto, é preferível o uso de um indutor de sono que não seja metabolizado pelo fígado, como o éter etílico (DE LIMA, 2006), especialmente quando se trata da avaliação de misturas complexas, como é o caso dos extratos vegetais.

O teste do sono induzido por éter etílico foi inicialmente proposto por VIEIRA (2001) para avaliar a potencial atividade sedativa de compostos. Geralmente substâncias depressoras do SNC aumentam a

¹ Disponível em: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>.

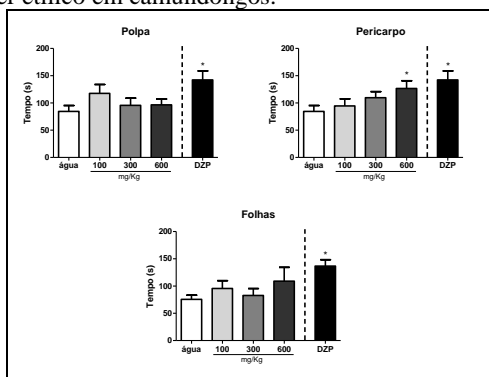
² Agradecemos à Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner, bem como aos demais participantes do grupo liderado pela Profa. Dra. Carmenza Duque da Universidad Nacional de Colombia pela coleta das espécies e preparação dos 11 extratos das folhas, pericarpo e/ou polpa das espécies *P. edulis* var. *edulis*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* var. *mollissima* cedidos. Agradecemos à MSc. Fernanda Angélica Madógllo e ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto por cederem os 3 extratos das folhas, pericarpo e polpa de *P. alata*.

duração do sono induzido por outros depressores do SNC, como o pentobarbital e o éter (DE LIMA, 2006).

2.4.1.1. Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. alata*

Levando-se em consideração o parâmetro “tempo de duração do sono”, foi possível observar que o extrato aquoso do pericarpo de *P. alata* na dose de 600 mg/kg aumentou a duração do sono dos animais quando comparado ao grupo controle [$F(3,28) = 2,2171$; $p = 0,058137$], efeito semelhante ao do grupo controle positivo diazepam, um fármaco com atividade hipno-sedativa além de ansiolítica, anticonvulsivante e relaxante muscular (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2011) (Fig. 2.3).

Figura 2.3: Efeitos do tratamento oral (gavagem) dos extratos aquosos da polpa, pericarpo e folhas de *P. alata* (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. $N = 8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. $*p \leq 0,05$ versus o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

A atividade sedativa para a espécie *P. alata* foi previamente descrita para extratos provenientes das folhas. Oga e colaboradores (1984) demonstraram a atividade sedativa do extrato fluido (75 e 150 mg/kg) obtido segundo o descrito na Farmacopeia Francesa VIII (1965), após administração intraperitoneal (*i.p.*) em camundongos no teste do sono induzido por pentobarbital. Outro trabalho também descreveu essa atividade para o extrato hidroetanólico (100 e 300 mg/kg) das folhas da espécie após a administração *i.p.* em camundongos avaliados no teste do

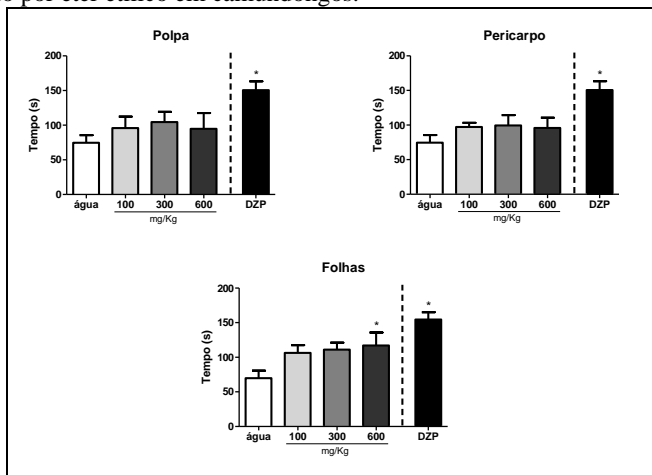
labirinto em cruz elevado, seguido pelo teste do campo aberto e o de suspensão pela cauda (ROMANINI et al., 2006). Também, Provensi e colaboradores (2008) verificaram a atividade sedativa dos extratos aquoso (300 mg/kg) e hidroetanólico (300 e 600 mg/kg) das folhas de *P. alata*, quando administrados por via oral (v.o.) em camundongos da linhagem CF1 no teste do sono induzido por pentobarbital. Deve-se ressaltar que no teste do sono barbitúrico utilizado por Provensi e colaboradores (2008), a indução do sono nos animais foi realizada por um barbitúrico e que fármacos dessa classe são metabolizados no fígado pela via oxidativa que envolve o citocromo P450, NADPH e O₂ (SHAH et al., 1996; WILKINSON, 2005; CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005). Compostos que interferem com a biotransformação do pentobarbital pelo complexo citocromo P450 podem, assim, produzir o mesmo perfil comportamental de substâncias depressoras do SNC (GOLOUBKOVA et al., 1998; CUPP, 1999; WHO, 1999; BLUMENTHAL; GOLDEBERG; BRINCKMANN, 2000), pois, ao competirem pelo mesmo sistema enzimático, as quantidades de pentobarbital circulante aumentam (já que há uma competição pelas mesmas enzimas de degradação), e o sono induzido pelo barbitúrico é potenciado (VIEIRA, 2001). Assim, o uso do éter, que não é metabolizado hepaticamente, evita resultados falso-positivos. Além dos trabalhos prévios descritos acima, Klein e colaboradores (2014) verificaram a atividade sedativa para o mesmo extrato aquoso das folhas deste trabalho por via oral (600 e 1200 mg/kg) no teste da telemetria em camundongos C57BL/6J. Nesse sentido, é importante lembrar que no teste da telemetria a manipulação dos animais é menor o que é um fator muito positivo para testes neurofarmacológicos observacionais, podendo torná-lo um teste sedativo mais sensível. Por outro lado, no trabalho de Klein e colaboradores (2014) levou-se em consideração apenas a locomoção dos animais e, com isso, compostos que prejudicam a movimentação do animal podem ser considerados erroneamente como sedativos. Com relação a esta observação, estudos recentes com um extrato aquoso das folhas da *P. alata* seco por *spray-dryer* mostrou-se genotóxico através dos testes cometa e micronúcleo em células de sangue periférico de camundongos CF1 três horas após a administração oral do extrato (BOEIRA et al., 2010) e, após tratamento oral durante 14 dias, o extrato inibiu o ganho de peso e causou algumas alterações hepáticas (BRAGA et al., 2013).

Em relação à avaliação da atividade sedativa de outras partes da espécie, o trabalho de Klein e colaboradores (2014) concorda com os resultados obtidos para o mesmo extrato aquoso do pericarpo desta tese, já que no teste da telemetria para avaliação da atividade sedativa, em camundongos C57BL/6J, os autores verificaram que esse extrato na dose de 600 mg/kg (mesma dose ativa descrita nesta tese) e 1200 mg/kg, após administração oral, era ativo.

2.4.1.2. Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. edulis* f. *edulis*

Como pode ser verificado na figura 2.4, dos três extratos de *P. edulis* f. *edulis* avaliados, apenas o extrato aquoso das folhas apresentou atividade sedativa na dose de 600 mg/kg [$F(3,28)=2,587$; $p=0,045841$], constatada pelo aumento do tempo do sono dos animais tratados.

Figura 2.4: Efeitos do tratamento oral dos extratos aquosos da polpa, pericarpo e folhas de *P. edulis* f. *edulis* (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. N = 8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

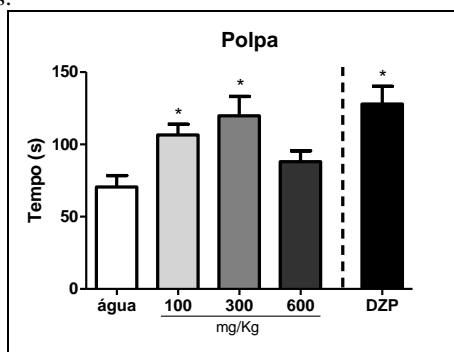
Existem relatos na literatura acerca da atividade sedativa da espécie *P. edulis* (MALUF et al., 1991), porém, a maioria dos trabalhos refere-se à forma *flavicarpa*, conhecido no Brasil como maracujá

amarelo ou maracujá azedo, a qual é amplamente cultivada para a produção de suco (SENA et al., 2009; DENG et al., 2010). Para a forma *edulis* apenas um estudo abordando a atividade sedativa do extrato aquoso das folhas foi encontrado. Nele, Li e colaboradores (2011) descrevem que os extratos hidroetanólicos de quatro diferentes materiais vegetais, contendo flavonoides, foram sedativos na dose de 400 mg/kg quando testados por via oral em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

2.4.1.3. Extrato aquoso da polpa de *P. ligularis*

Para a espécie *P. ligularis* não foi encontrado nenhum trabalho na literatura referente à avaliação da atividade no SNC. Neste trabalho foi avaliado o extrato aquoso da polpa frente ao teste de sono induzido por éter etílico. Em um primeiro momento, testou-se o extrato nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg e observou-se que as doses de 100 e 300 mg/kg aumentaram o tempo de duração do sono dos animais, quando comparados ao grupo controle [$F(3,28) = 5,231$; $p = 0,0054$] (Fig. 2.5).

Figura 2.5: Efeitos do tratamento oral do extrato aquoso da polpa de *P. ligularis* (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



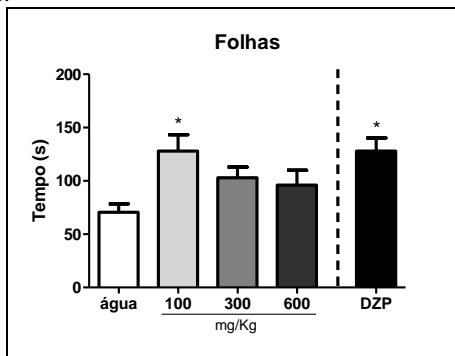
O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8-10$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Vale salientar que esse é o primeiro relato acerca da atividade no SNC de extratos provenientes de *P. ligularis*.

2.4.1.4. Extrato aquoso das folhas de *P. manicata*

Também para *P. manicata* ressalta-se a ausência de qualquer trabalho concernente à avaliação da atividade no SNC. É importante lembrar que essa espécie não apresenta frutos comestíveis. Dessa forma, utilizou-se neste trabalho o extrato aquoso das folhas, o qual apresentou atividade sedativa na dose de 100 mg/kg [$F(3,28) = 3,725$; $p = 0,0227$] quando administrado aos camundongos avaliados no teste do sono induzido por éter etílico (Fig. 2.6).

Figura 2.6: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de *P. manicata* (100, 300 e 600 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

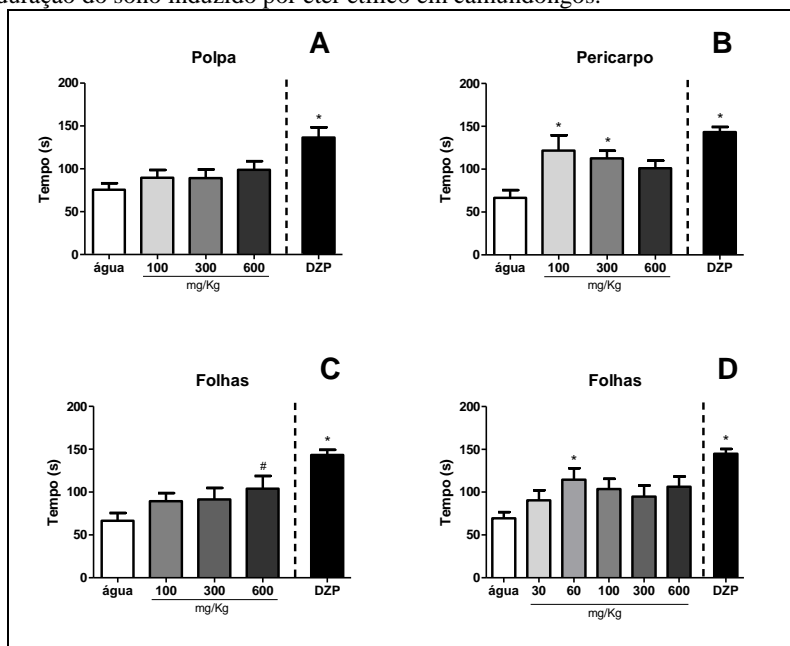
Esse também é o primeiro relato acerca da atividade no SNC de extratos provenientes de *P. manicata*.

2.4.1.5. Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. quadrangularis*

Quando os extratos dessa espécie foram testados nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg, o extrato aquoso do pericarpo foi ativo na dose de 100 e 300 mg/kg [$F(3,27) = 3,859$; $p = 0,0203$] e o extrato aquoso das folhas mostrou uma tendência para apresentar atividade na dose de 600 mg/kg [$F(3,27) = 1,578$; $p = 0,099604$] (Figs. 2.7B e C).

Devido à tendência de atividade observada para o extrato das folhas dessa espécie, além da observação de uma possível curva dose-resposta em forma de U (Fig. 2.7C - o que sugere a presença de atividade em doses maiores ou menores das testadas em função de diferentes constituintes químicos em diferentes concentrações), procedeu-se o estudo com doses menores do extrato. Assim, foi possível observar que o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* aumentou o tempo de duração do sono dos camundongos, na dose de 60 mg/kg, quando comparado ao grupo controle [$F(5,49)= 1,716$; $p=0,050720$], efeito sugestivo de uma atividade sedativa (Fig. 2.7D).

Figura 2.7: Efeitos do tratamento oral com os extratos aquosos da polpa (A - 100, 300 e 600 mg/kg), pericarpo (B - 100, 300 e 600 mg/kg) e folhas (C - 100, 300 e 600 mg/kg e D - 30, 60, 100, 300 e 600 mg/kg) de *P. quadrangularis* na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8-10$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ e # $0,1 < p < 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

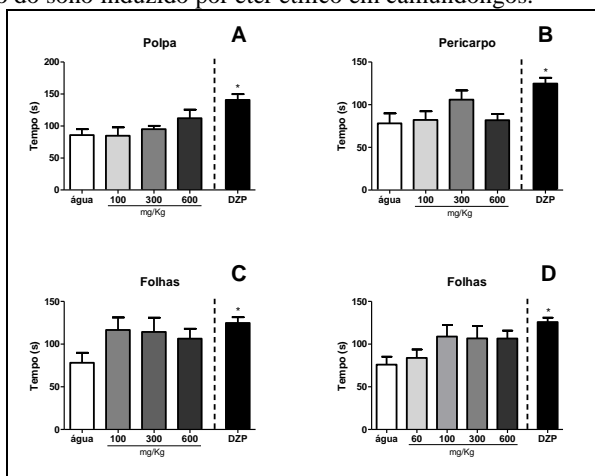
Esse também é o primeiro relato acerca da atividade sedativa de extratos de *P. quadrangularis*. Apenas um trabalho prévio sobre a avaliação de atividades no SNC da espécie foi encontrado. Nesse trabalho, Castro e colaboradores (2007) observaram a atividade tipo-ansiolítica para um extrato das folhas, o que será discutido posteriormente.

A espécie *P. quadrangularis* mostrou-se a espécie mais promissora para a continuidade deste trabalho, já que dois extratos de partes diferentes da planta apresentaram atividade sedativa em doses relativamente baixas. Diante dos resultados obtidos, os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* foram utilizados para avaliação de outras atividades neurofarmacológicas neste trabalho, paralelamente ao fracionamento dos mesmos bioguiado pela atividade sedativa.

2.4.1.6. Extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. tripartita* f. *mollissima*

Os extratos de *P. tripartita* f. *mollissima* foram inicialmente avaliados nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. Nessas doses, não foi constatada uma atividade sedativa (Fig. 2.8). Porém, é possível observar que o extrato das folhas aparentemente apresenta ter uma correlação inversa entre a duração do sono dos camundongos e a dose administrada, ou seja, possivelmente doses menores que 100 mg/kg poderiam ser ativas. Desta forma, a dose de 60 mg/kg foi testada, mas também não se observou qualquer atividade sedativa.

Figura 2.8: Efeitos do tratamento oral com os extratos aquosos da polpa (**A** - 100, 300 e 600 mg/kg), pericarpo (**B** - 100, 300 e 600 mg/kg) e folhas (**C** - 100, 300 e 600 mg/kg e **D** - 60, 100, 300 e 600 mg/kg) de *P. tripartita* f. *mollissima* na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-10$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. $*p \leq 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Cabe salientar que na Colômbia é possível encontrar à venda fitoterápicos à base de extratos das folhas dessa espécie vegetal aprovados pelo Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos-INVIMA (órgão responsável pela regulamentação de medicamentos daquele país, o equivalente à nossa ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária) indicados como sedativos e hipnóticos (COLÔMBIA, 1997; 2004a,b). No entanto, não foram encontrados na literatura relatos sobre a atividade no SNC dessa espécie. Deve-se levar em consideração que o medicamento fitoterápico é composto pelo extrato hidroetanólico e, por esse motivo, a composição química pode ser diferente, o que poderia refletir em atividades farmacológicas diferentes.

2.4.2. Análise dos flavonoides presentes nos extratos vegetais

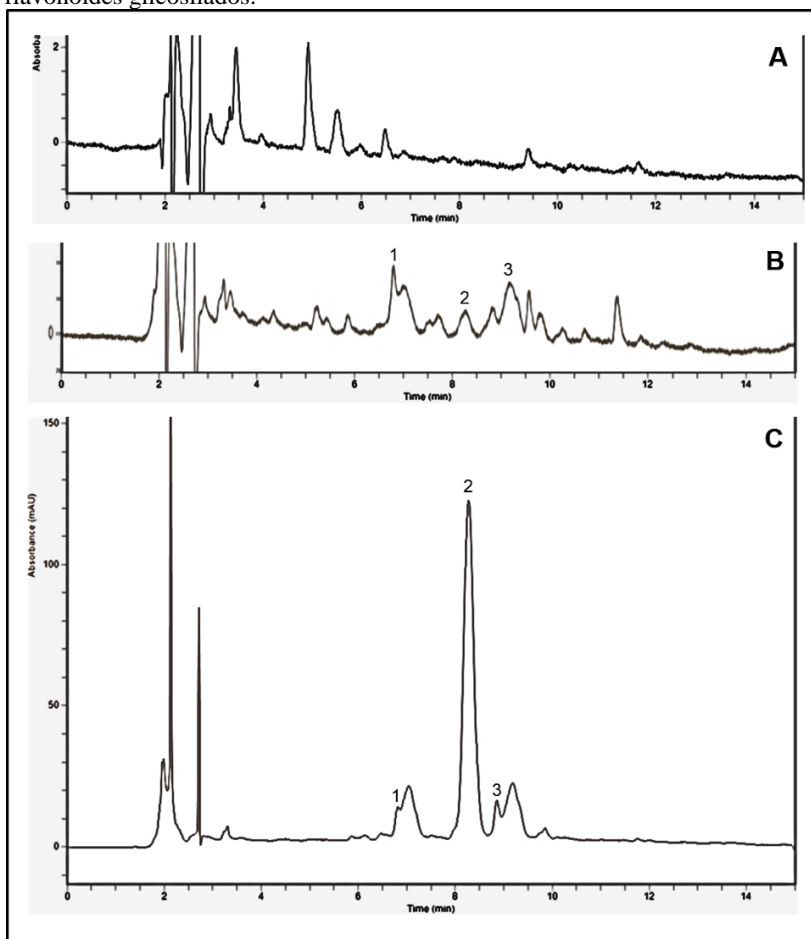
Os flavonoides são compostos majoritários em espécies do gênero *Passiflora* e a maioria dos estudos sugere que os mesmos são

responsáveis por atividades no SNC. Assim, foram realizadas a avaliação da presença e a identificação desses compostos nos extratos utilizados neste estudo. Para isso, os extratos foram co-eluídos com compostos de referência por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.4.2.1. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. alata*

Observou-se nos cromatogramas obtidos por CLAE (Fig. 2.9) que os três extratos dessa espécie apresentam flavonoides glicosilados de acordo com o comportamento cromatográfico (tempo de retenção e comparação com amostras autênticas). O extrato proveniente das folhas apresentou uma maior área dos picos referentes a esses compostos. Ainda, foi possível identificar isoorientina (1), vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (2) e isovitexina (3) nos extratos aquosos do pericarpo (Fig. 2.9B) e folhas (Fig. 2.9C) da espécie. A identificação foi realizada com base nos espectros UV e comportamento cromatográfico compatíveis com padrões. Entretanto, devido à baixa quantidade de flavonoides glicosilados no extrato aquoso da polpa (fig. 2.9A), a sua identificação não foi possível.

Figura 2.9: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de *Passiflora alata* para visualização dos flavonoides glicosilados.



1- isoorientina, 2- vitexina-2''-O-ramnosídeo, 3- isovitexina. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

Madóglgio (2011), que utilizou o mesmo material vegetal deste trabalho, já havia observado a presença dos flavonoides descritos acima. Ainda, além dos compostos citados, foi relatada a presença de orientina nas folhas e pericarpo e rutina no pericarpo foi relatada.

Outro trabalho recente descreve a presença de isoorientina, isovitexina, orientina e vitexina-2''-*O*-ramnosídeo no extrato aquoso das folhas de *P. alata*, sendo esse último composto o majoritário, também observado no extrato aquoso do pericarpo da espécie (ZUCOLOTTO et al., 2012).

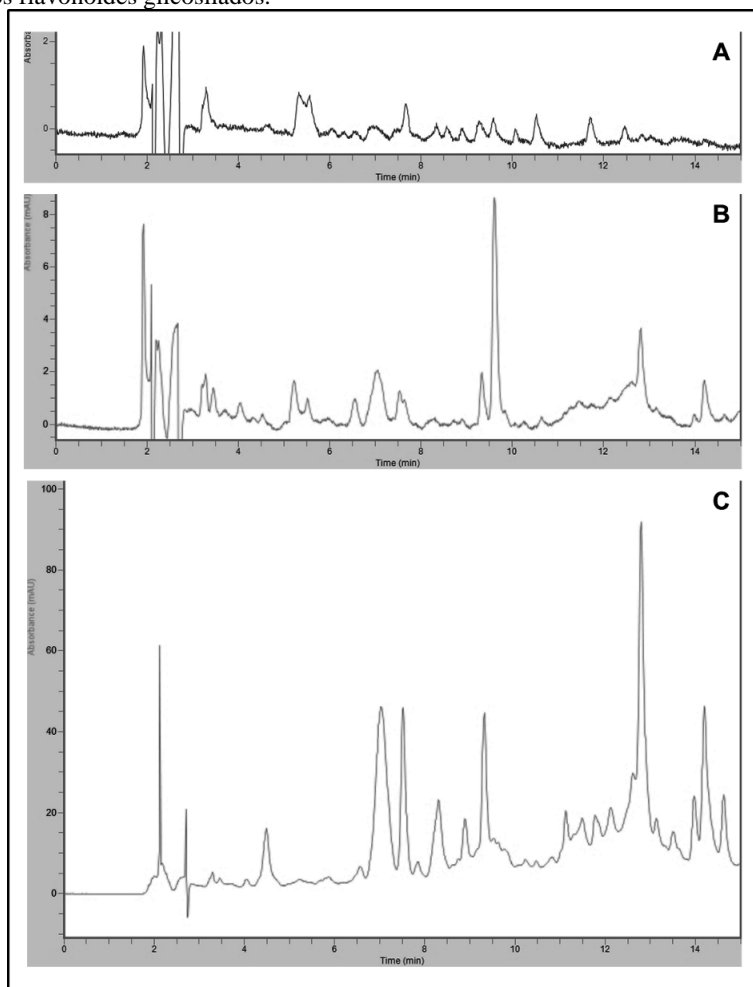
Todos os compostos mencionados acima já haviam sido previamente descritos para extratos provenientes das folhas de *P. alata* (ULUBELEN et al., 1982a,b; OGA et al., 1984; PEREIRA et al. 2004; DOYAMA et al., 2005). No entanto, para o pericarpo de *P. alata* não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a presença de flavonoides glicosilados, como aqui encontrado.

2.4.2.2. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. edulis* f. *edulis*

Assim como para *P. alata*, todos os extratos de *P. edulis* f. *edulis* utilizados neste trabalho apresentam substâncias com características cromatográficas de flavonoides glicosilados, sendo que estes se encontram em maior teor no extrato das folhas quando comparado aos extratos do pericarpo e polpa a julgar pela absorção de seus picos.

Quanto à identificação dos flavonoides glicosilados, o extrato das folhas (Fig. 2.10C) apresentou substâncias com tempo de retenção semelhante ao da vitexina-2''-*O*-ramnosídeo e isoorientina, enquanto que no extrato do pericarpo (Fig. 2.10B) e da polpa (Fig. 2.10A) foram observadas substâncias com tempo de retenção próximo ao da isoorientina e 6,8-di-*C*-glicosil-crisina, respectivamente. No entanto, a presença desses compostos não foi confirmada, já que experimentos de coeluição utilizando os mesmos extratos indicaram tratar-se de outros compostos, ainda não identificados (ZUCOLOTTO et al. 2012).

Figura 2.10: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de *Passiflora edulis* f. *edulis* para visualização dos flavonoides glicosilados.



Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

Muitos são os trabalhos sobre o isolamento de flavonoides da espécie *P. edulis*, porém, de modo geral, os autores não especificam qual forma utilizada no estudo. Dos trabalhos encontrados, apenas dois indicam tratar-se diretamente da forma *P. edulis* f. *edulis*. Nesses

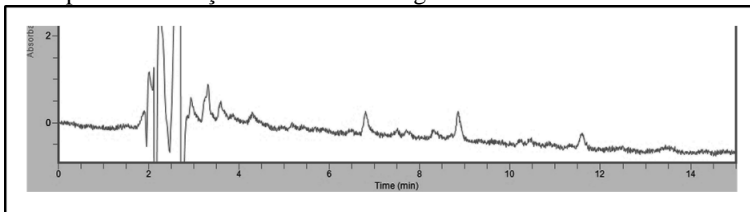
trabalhos é descrita a identificação de luteolina, luteolina-6-*C*-glicosídeo (ICHIMURA et al., 2006), quercetina-3-*O*-glicosídeo, luteolina-8-*C*-neohesperosídeo, luteolina-8-*C*-digitoxosídeo e quercetina (ZIBALDI et al., 2007) em extratos provenientes do pericarpo de *P. edulis* f. *edulis*.

Destaca-se um trabalho relativamente recente no qual Li e colaboradores (2011) analisaram comparativamente por CLAE-DAD extratos das folhas das duas formas da espécie, *P. edulis* f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. Esses autores apontam para a presença dos flavonoides *C*-glicosilados lucenina-2, vicenina-2, isoorientina, isovitexina, luteolina-6-*C*-quinovosídeo e luteolina-6-*C*-fucosídeo na forma *flavicarpa*, porém não conseguiram identificar nenhum dos compostos presentes nos extratos da forma *edulis*. Ainda, os autores descrevem que os cromatogramas da forma *flavicarpa* são completamente diferentes dos cromatogramas obtidos para a forma *edulis*, sendo que naqueles, grande parte dos compostos eluíram entre 16 e 24 min e nos últimos entre 54 e 90 min (LI et al. 2011), comprovando a diferente composição química dessas duas formas.

2.4.2.3. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes no extrato aquoso da polpa de *P. ligularis*

No cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato aquoso da polpa (Fig. 2.11) foi possível observar a presença de alguns compostos com características cromatográficas de flavonoides glicosilados. Esses compostos não puderam ser identificados devido ao seu baixo teor. Não foram encontrados estudos acerca da composição química da polpa, apenas o relato da presença de flavonoides *C*-glicosídeos em extratos das folhas e do pericarpo da espécie (ZUCOLOTTO et al., 2012).

Figura 2.11: Cromatograma do extrato aquoso obtido da polpa de *Passiflora ligularis* para visualização dos flavonoides glicosilados.

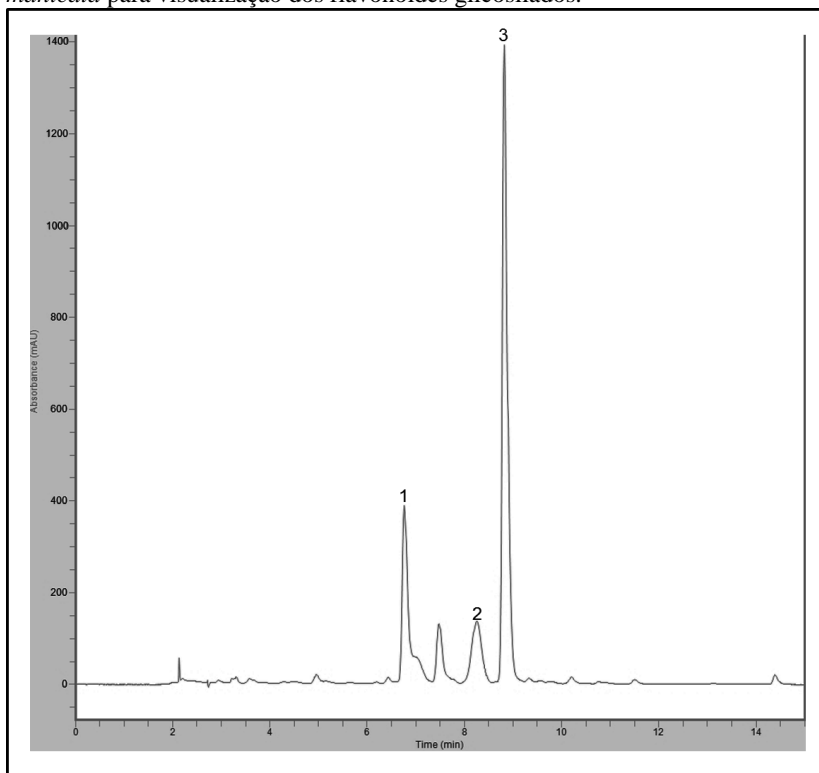


Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

2.4.2.4. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes no extrato aquoso das folhas de *P. manicata*

No extrato aquoso das folhas de *P. manicata* foram caracterizados através da análise por CLAE-DAD (Fig. 2.12) isoorientina (1), vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (2) e isovitexina (3). Além disso, verificou-se que a isovitexina é o flavonoide majoritário desse extrato.

Figura 2.12: Cromatograma do extrato aquoso obtido das folhas de *Passiflora manicata* para visualização dos flavonoides glicosilados.



1- isoorientina, 2- vitexina-2-*O*-ramnosídeo, 3- isovitexina. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

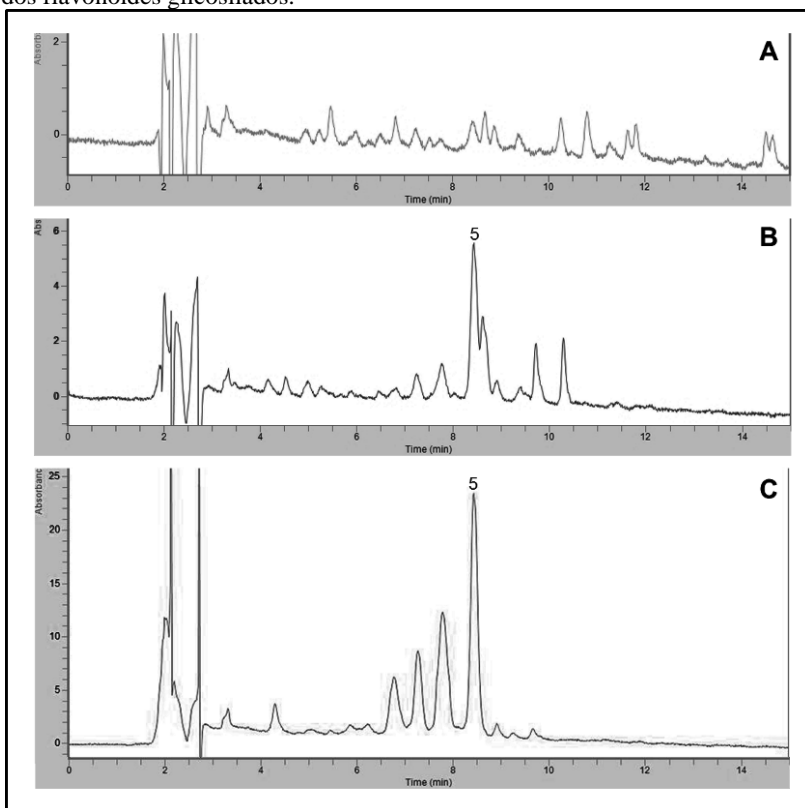
Zucolotto e colaboradores (2012), que investigaram a composição química desse mesmo extrato, observaram além dos compostos já citados, a presença de orientina e vitexina. Ainda, outros autores descreveram a presença de isovitexina, vitexina, orientina e isoorientina

em outro extrato das folhas de *P. manicata* (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002).

2.4.2.5. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. quadrangularis*

Nos cromatogramas mostrados na figura 2.13 ficou evidente a presença de compostos com características cromatográficas correspondentes a flavonoides glicosilados nos extratos aquosos das partes aéreas utilizados neste estudo. Neles é possível ainda inferir a presença de um maior teor desses compostos nas folhas (Fig. 2.13C) quando comparado à polpa (Fig. 2.13A) e ao pericarpo (Fig. 2.13B) da espécie. Ainda, foi possível identificar a presença de vitexina-2''-*O*-xilósídeo (5) no extrato aquoso das folhas e do pericarpo. Esse composto, que é o flavonoide majoritário do extrato das folhas, foi isolado com o auxílio de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) e sua estrutura foi elucidada em parceria com o doutor Geison Modesti Costa (COSTA, 2013). A quantificação de vitexina-2''-*O*-xilósídeo no extrato das folhas também foi realizada obtendo-se o resultado de 29,16 mg da substância por cada grama do extrato (COSTA et al., 2013).

Figura 2.13: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de *Passiflora quadrangularis* para visualização dos flavonoides glicosilados.



5- vitexina-2''-O-xilosídeo. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

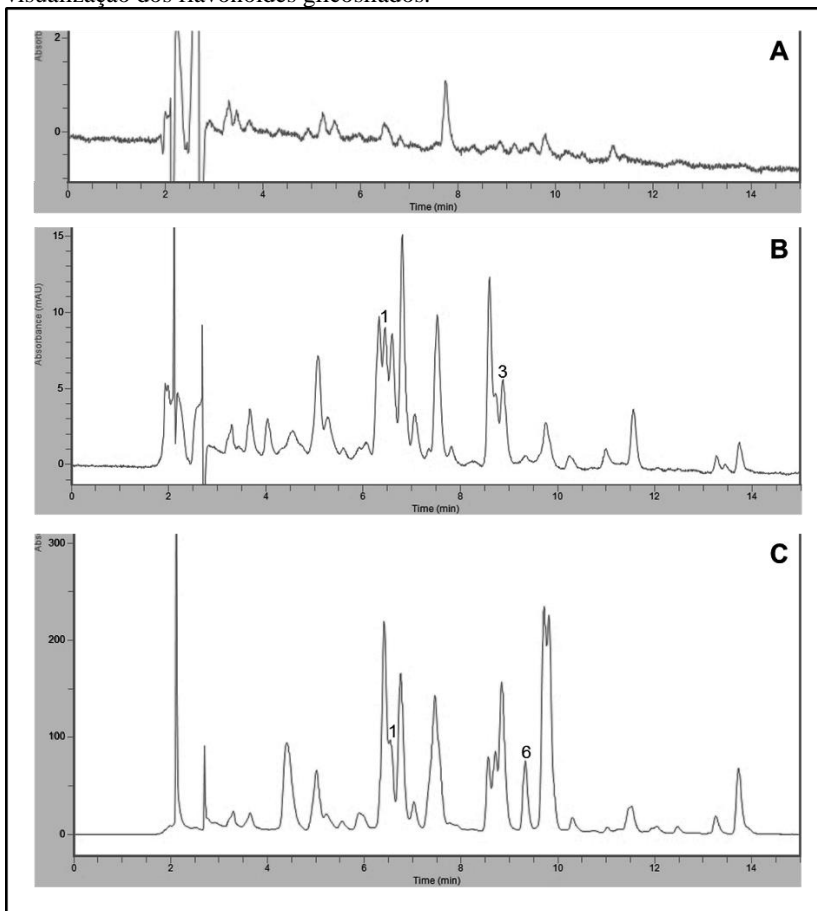
Previamente a este estudo, Zucolotto e colaboradores (2012) descreveram a presença de vitexina-2-O-ramnosídeo como um dos compostos minoritários desse mesmo extrato obtido das folhas. Posteriormente, Costa e colaboradores (2012) compararam o perfil químico desse extrato com o extrato das folhas de *P. alata* (mesmo extrato utilizado neste estudo) e verificaram que os compostos majoritários, vitexina-2''-O-xilosídeo (predominante em *P. quadrangularis*) e vitexina-2-O-ramnosídeo (predominante em *P. alata*) poderiam ser utilizados como marcadores químicos para diferenciar as

espécies, já que a diferenciação botânica entre elas é difícil devido à similaridade das folhas e flores.

2.4.2.6. Caracterização dos flavonoides glicosilados presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa de *P. tripartita* f. *mollissima*

As análises por CLAE-DAD dos extratos das partes aéreas de *P. tripartita* f. *mollissima* (Fig. 2.14) apresentaram uma grande variedade de compostos com características cromatográficas de flavonoides glicosilados. Assim como para as demais espécies desse trabalho, o extrato das folhas apresenta maior teor desses flavonoides quando comparado aos extratos provenientes das partes dos frutos. Com relação à identidade desses flavonoides, foi possível verificar a presença de isoorientina (1) e isovitexina (3) no extrato do pericarpo (Fig. 2.14B) e de isoorientina (1) e swertisina (6) no extrato das folhas (Fig. 2.14C). Por outro lado, no extrato da polpa (Fig. 2.14A) a presença de compostos com comportamento de flavonoides glicosilados é pouco expressiva, não permitindo sua identificação.

Figura 2.14: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos da polpa (A), do pericarpo (B) e das folhas (C) de *Passiflora tripartita* f. *mollissima* para visualização dos flavonoides glicosilados.



1- isoorientina, 3- isovitexina, 6- swertisina. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

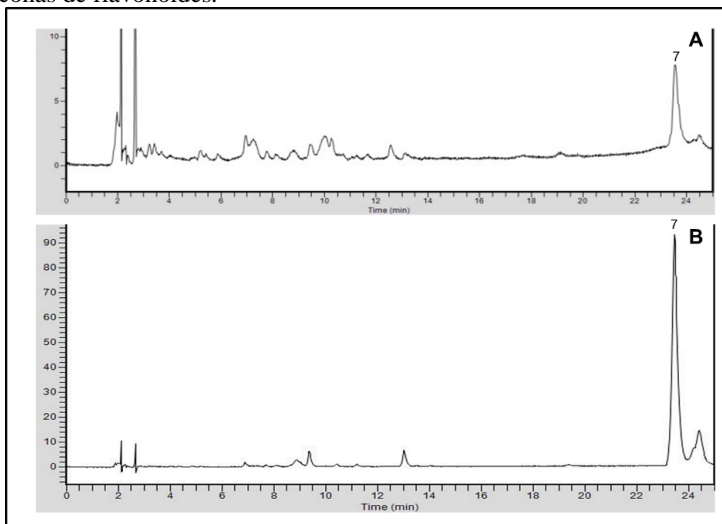
A presença de isoorientina e swertisina nesse mesmo extrato obtido das folhas, bem como de isoorientina e isovitexina no mesmo extrato do pericarpo foi previamente descrita por Zucolotto e colaboradores (2012). Foi relatada ainda a presença de orientina, vitexina, isovitexina e vicianina-2 nas folhas e de orientina no pericarpo (ZUCOLOTTO et al., 2012).

Estudos prévios, realizados com outros materiais vegetais indicam a presença de isovitexina (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002) e 4'-*O*-metil-luteolina-8-*C*-6''-acetilglicopiranosídeo (RAMOS et al., 2010) em extratos das folhas de *P. tripartita* f. *mollissima*.

2.4.2.7. Caracterização de agliconas de flavonoides presentes nos extratos aquosos das folhas, pericarpo e polpa das espécies de *Passiflora*

Posteriormente às análises dos flavonoides glicosilados, foram realizadas análises buscando detectar a presença de agliconas de flavonoides para todos os extratos de *Passiflora*. Para isso, aumentou-se o tempo da análise do método empregado para a observação dos flavonoides glicosilados. Nos cromatogramas obtidos ficou evidente a presença de um pico majoritário com tempo de retenção de 23,6 min nos extratos aquosos do pericarpo de *P. alata* (Fig. 2.15A) e *P. quadrangularis* (Fig. 2.15B), o qual foi identificado como apigenina por coeluição com amostra autêntica.

Figura 2.15: Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos do pericarpo de *Passiflora alata* (A) e *Passiflora quadrangularis* (B) para visualização das agliconas de flavonoides.



7- apigenina. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

A apigenina é o flavonoide majoritário dos extratos e foi quantificada (dados da validação apresentados na tabela 2.1) na proporção de $0,227 \pm 0.008$ mg/g do extrato seco de *P. alata* e $2,449 \pm 0.004$ mg/g do extrato de *P. quadrangularis*. Conforme a revisão realizada, não foram encontrados na literatura trabalhos anteriores que descrevessem a presença de apigenina em extratos do pericarpo dessas espécies.

Tabela 2.1: Dados de validação para apigenina por CLAE-DAD.

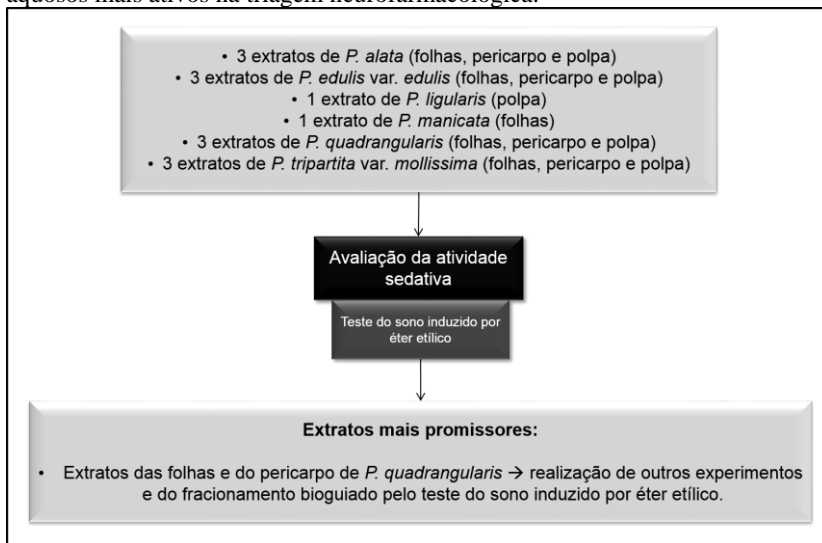
Flavonoide	Linearidade (µg/ml)	Equação da reta ^a	Fator de correlação (r ²)	LOD ^b (µg/ml)	LOQ ^b (µg/ml)
Apigenina	0,5 – 40	$y = 112834x - 23037$	0,9996	0,0625	0,25

^aSeis pontos (n = 3). ^bLOQ = limite de quantificação, LOD = limite de detecção.

2.4.3. Seleção de extratos para estudos mais aprofundados

Considerando o conjunto de resultados, sumarizados na figura 2.16, pode-se concluir que os extratos mais ativos na triagem neurofarmacológica foram os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis*, os quais foram escolhidos para realização da avaliação de outras atividades no SNC, bem como o fracionamento bioguiado pela atividade sedativa.

Figura 2.16: Esquema representativo do prosseguimento dado aos extratos aquosos mais ativos na triagem neurofarmacológica.



2.5. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Na triagem neurofarmacológica, realizada através da administração oral dos extratos de *Passiflora* no teste do sono induzido por éter etílico com camundongos, os seguintes extratos apresentaram atividade sedativa nas respectivas doses:
 - Extrato aquoso do pericarpo de *P. alata* (600 mg/kg);
 - Extrato aquoso das folhas de *P. edulis* f. *edulis* (600 mg/kg);
 - Extrato aquoso da polpa de *P. ligularis* (30, 100 e 300 mg/kg);
 - Extrato aquoso das folhas de *P. manicata* (100 mg/kg);
 - Extratos aquosos das folhas e pericarpo de *P. quadrangularis* (60 mg/kg nas folhas; 100 e 300 mg/kg no pericarpo).
- Nenhum dos extratos aquosos de *P. tripartita* f. *mollissima* apresentou atividade sedativa nas doses administradas nesse teste.
- Na análise fitoquímica dos 14 extratos avaliados foi possível verificar a presença de compostos com característica cromatográfica de flavonoides em todos os extratos.
- Nas espécies onde foram avaliados os extratos das folhas, do pericarpo e da polpa, a julgar pela intensidade relativa dos picos e

maior quantidade de picos observado para extratos analisados na mesma quantidade, as folhas apresentam maior quantidade de flavonoides, seguidas do pericarpo e por último da polpa.

- Foi possível identificar através dos cromatogramas obtidos por CLAE, a presença dos seguintes flavonoides em cada extrato vegetal das espécies estudadas:
 - *Passiflora alata*:
 - Extrato aquoso das folhas: isoorientina, isovitexina e vitexina-2''-O-ramnosídeo;
 - Extrato aquoso do pericarpo: apigenina como flavonoide predominante.
 - *Passiflora manicata*:
 - Extrato aquoso das folhas: isoorientina, vitexina-2''-O-ramnosídeo e isovitexina, sendo isovitexina o flavonoide majoritário.
 - *P. quadrangularis*:
 - Extrato aquoso das folhas: vitexina-2''-O-xilosídeo, sendo ela o flavonoide majoritário;
 - Extrato aquoso do pericarpo: vitexina-2''-O-xilosídeo e apigenina, sendo esse o flavonoide majoritário.
 - *P. tripartita* f. *mollissima*:
 - Extrato aquoso das folhas: isoorientina e swertisina;
 - Extrato aquoso do pericarpo: isoorientina e isovitexina.
- Na análise quantitativa das agliconas de flavonoides presentes nos extratos, apigenina foi quantificada na proporção de 0,227 mg e 2,449 mg por grama dos extratos aquosos dos pericarpos de *P. alata* e *P. quadrangularis*, respectivamente.
- Considerando os resultados obtidos, os extratos das folhas e do pericarpo de *P. quadrangularis* foram escolhidos para a realização de outros testes neurofarmacológicos e para o fracionamento bioguiado pela atividade sedativa.

**CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES NO SNC E
FRACIONAMENTO FITOQUÍMICO
BIOGUIADO DOS EXTRATOS
AQUOSOS DO PERICARPO E DAS
FOLHAS DE *P. quadrangularis***

3.1. INTRODUÇÃO

Como evidenciado ao final do capítulo anterior, os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* mostraram grande potencialidade de efeitos sobre o SNC, produzindo atividade sedativa nos animais que receberam por via oral esses extratos. Nesse sentido, será descrito neste capítulo um estudo mais aprofundado, tanto no que concerne a avaliação de outras atividades no SNC dos extratos escolhidos, como a obtenção dos componentes ativos bioguiado pela atividade sedativa.

No presente capítulo, é apresentada uma breve revisão dos receptores GABAérgicos e da técnica eletrofisiológica do tipo *voltage clamp*. São também apresentados os resultados obtidos com os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis*, respectivamente, incluindo o fracionamento bioguiado, a obtenção dos compostos que apresentaram atividade sedativa e a avaliação do envolvimento da via GABAérgica no mecanismo de ação dos mesmos. Ressalta-se que na avaliação do mecanismo de ação dos compostos foi utilizado o teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* realizado durante o estágio doutoral da autora deste trabalho na Universidade de Viena (Viena – Áustria)³.

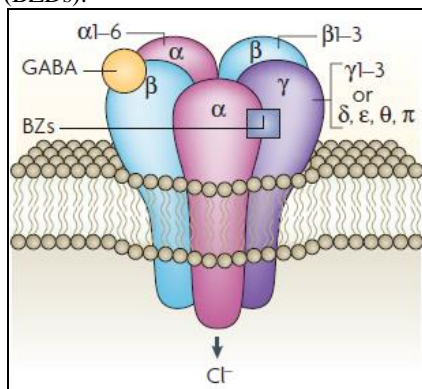
3.1.1. A técnica eletrofisiológica do tipo *voltage clamp* e os receptores GABAérgicos

Muitos fármacos promovem seus efeitos sistêmicos num organismo vivo após sua ligação aos receptores acoplados a canais iônicos presentes nas membranas celulares de determinadas células, como no caso dos benzodiazepínicos que são os fármacos sedativos de uso mais amplo. Esses fármacos atuam através da ligação a um sítio específico dos receptores GABA_A (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005). Os receptores GABA_A são canais iônicos de cloreto (Cl⁻), contendo cinco subunidades transmembrana, as quais podem pertencer a sete subfamílias (α , β , γ , δ , ϵ , θ e π) (Fig. 3.1). Os benzodiazepínicos ao se ligarem em seu sítio específico nos receptores GABA_A (na interface

³ A autora Andressa Córneo Gazola agradece não apenas à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela disponibilização da bolsa de estudos no exterior como também ao Prof. Dr. Steffen Hering por permitir o estágio doutoral em seu laboratório e a todos que fazem parte do Departamento de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Viena pela receptividade e disponibilidade para ensinar as técnicas.

entre as subunidades α e γ) potencializam a ligação do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) ao seu sítio específico e intensificam as correntes iônicas induzidas por esse neurotransmissor (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005; JACOB; MOSS; JURD, 2008). Após a ligação do GABA (na interface entre as subunidades α e β), os receptores GABA_A se abrem permitindo a entrada de Cl^- para o meio intracelular causando hiperpolarização da membrana com consequente inibição da formação de um potencial de ação, inibindo assim a atividade no SNC (BLOOM, 2005; JACOB; MOSS; JURD, 2008).

Figura 3.1: Esquema representativo do receptor GABA_A com suas 5 subunidades transmembranais compostas pelas subfamílias α , β , γ , δ , ε , θ e π e os locais de ligação do ácido γ -aminobutírico (GABA) e dos fármacos benzodiazepínicos (BZDs).

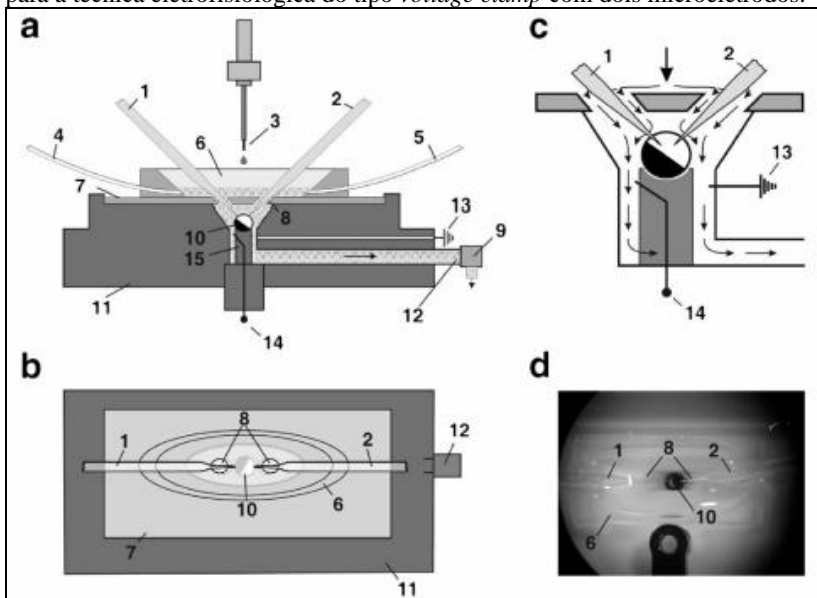


Fonte: JACOB; MOSS; JURD, 2008.

A técnica do tipo *voltage clamp* permite que o fluxo de íons através da membrana celular seja medido na forma de diferença de potencial (corrente elétrica), enquanto a voltagem da membrana é mantida sob controle de um amplificador (HALLIWELL et al., 1994). Dessa forma, por exemplo, é possível avaliar com essa técnica o influxo de íons Cl^- intracelular em células que apresentam, em sua membrana citoplasmática, receptores GABA_A, inferindo assim a ativação desse receptor.

No presente trabalho foi utilizada a técnica *voltage clamp* com dois microeletrodos em um sistema automatizado de perfusão rápida (Fig. 3.2).

Figura 3.2: Esquemas representativos e fotografia de uma câmara de perfusão para a técnica eletrofisiológica do tipo *voltage clamp* com dois microeletrodos.



(a) Corte transversal e (b) vista superior. Dois microeletrodos (1 e 2) são inseridos através das entradas de acesso inclinadas (8) que atravessam uma placa de cobertura de vidro (7) que delimita a câmara (~ 15 μ L) onde as células (10) ficam imersas em solução tampão. As soluções dos compostos teste são aplicadas pela ponta do braço de manuseio automatizado (3) sobre um funil reservatório feito de quartzo (6) comunicante com a câmara celular. A célula é acomodada sobre um dispositivo de suporte cilíndrico (15) ligado ao corpo da câmara (11). Por meio de uma bomba acoplada a uma seringa (9), ocorre a saída do líquido da câmara quando desejado (12). A solução residual é removida do funil reservatório, antes da aplicação dos compostos teste através de duas saídas ligadas a uma bomba (4 e 5). Além do eletrodo de referência “terra” (13), o suporte cilíndrico que acomoda a célula contém um eletrodo de referência (14), que serve como uma referência extracelular para o eletrodo potencial. (c) desenho esquemático do fluxo da solução para dentro da câmara de perfusão e do intervalo anular à volta do cilindro com a célula. (d) Foto da câmara de perfusão. Uma célula (10) é colocada sobre o suporte cilíndrico e empalada por dois microeletrodos (1,2) rodeadas pelo funil (6). Fonte: BABURIN et al., 2006.

Na técnica usada, a célula a ser estudada é penetrada por dois microeletrodos, sendo que um deles registra a diferença de potencial e o outro induz uma corrente. Assim, um pré-amplificador registra o

potencial de membrana e outro amplificador induz a corrente que controla esse potencial (HALLIWELL et al., 1994). Nos experimentos, as células a serem analisadas são colocadas em uma câmara com um dreno no lado inferior contendo solução tampão, e as soluções dos compostos a serem testados são aplicadas na câmara sobre as células. Com a automatização, é possível realizar a perfusão rápida das células para estudos de canais iônicos ativados por ligantes o que permite uma ativação aparentemente mais rápida dos canais e substancial sensibilização dos receptores levando a valores de pico de corrente mais reais do que no método de perfusão comum (BABURIN et al., 2006).

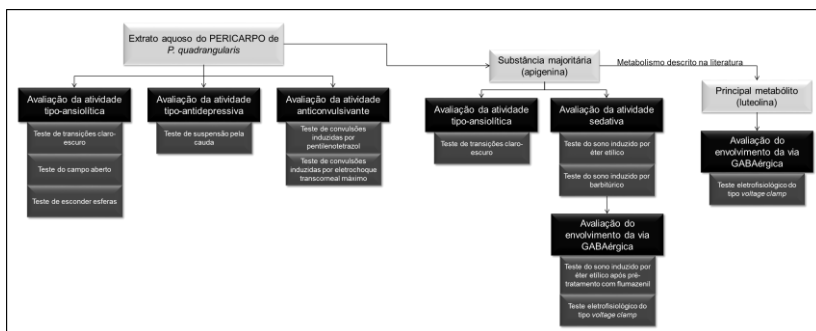
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as atividades tipo-ansiolítica, tipo-antidepressiva e anticonvulsivante para o extrato aquoso do pericarpo de *Passiflora quadrangularis*;
- Analisar a atividade tipo-ansiolítica para o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*
- Realizar um fracionamento químico bioguiado pela atividade sedativa para os extratos aquosos das folhas e do pericarpo de *P. quadrangularis* com o intuito de obter uma substância isolada de cada um dos extratos que apresente significativa atividade sedativa;
- Investigar possíveis mecanismos de ação sedativa dos compostos isolados dos extratos.

Uma visão geral dos procedimentos utilizados para alcançar os objetivos elencados acima é apresentada esquematicamente.

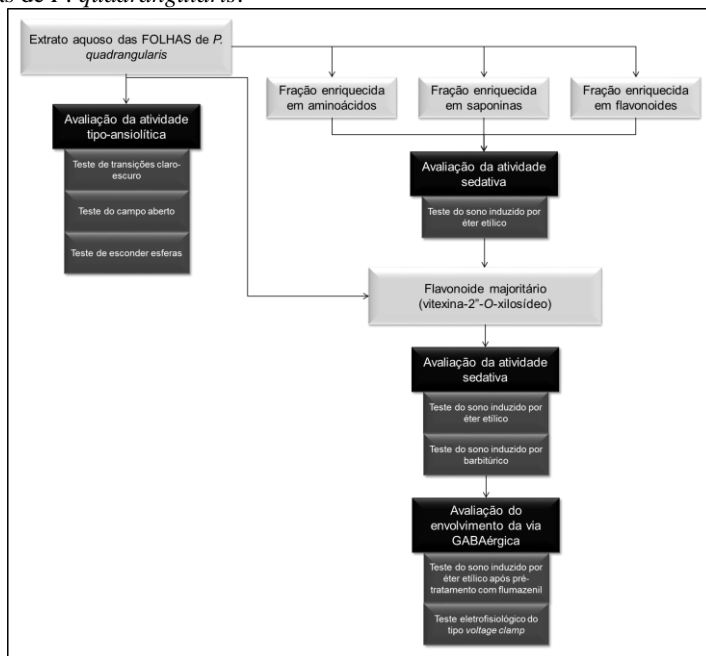
Na figura 3.3 são mostrados os procedimentos realizados para o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*.

Figura 3.3: Esquema representativo dos procedimentos realizados para os testes neurofarmacológicos e fracionamento bioguiado do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*.



Os procedimentos realizados com o extrato aquoso das folhas da espécie estão representados na figura 3.4.

Figura 3.4: Esquema representativo dos procedimentos realizados para os testes neurofarmacológicos e fracionamento bioguiado do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*.



3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Solventes, reagentes, fármacos e outros materiais utilizados

- Metanol P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Cromatoplasacas de gel de sílica 60F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Düren, Zurique);
- Acetato de etila P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Acetona P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Ácido acético P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- 2-aminoetil difenilborinato (Fluka®, Buchs, Suíça). Utilizado no preparo do reagente natural (solução metanólica 1%);
- *p*-anisaldeído (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Utilizado no preparo do anisaldeído sulfúrico (Solução obtida após dissolução de 0,5 g de anisaldeído em 100 ml de metanol com posterior adição de 4 ml de ácido clorídrico e 5 ml de ácido sulfúrico);
- Butanol P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha);
- Ninhidrina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Utilizada no preparo de solução cromogênica nas CCDs (1,5g ninhidrina em 100 ml de *n*-butanol com posterior adição de 3,0 ml de ácido acético);
- Metanol HPLC (Tedia®, RJ, Brasil);
- Acetonitrila HPLC (Tedia®, RJ, Brasil);
- Ácido fórmico HPLC (Tedia®, RJ, Brasil);
- 6,8-di-*C*-glicosil-crisina (cedida pelo Dr Norberto Peporine Lopes – USP ribeirão Preto -, isolada das folhas de *Lychnophora ericoides*);
- Isoorientina (Extrasynthèse®, Genay, França);
- Isovitexina (Fluka®, Buchs, Suíça);
- Vitexina-2''-O-xilosídeo (isolada das folhas de *Passiflora quadrangularis*);
- Swertisina (isolada pela autora durante seu mestrado das raízes de *Wilbrandia ebracteata* – GAZOLA, 2008);
- Vitexina-2''-O-ramnosídeo (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA);
- Amberlite® IR120 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA);
- Ácido clorídrico P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha) diluído com água destilada até obter a concentração 1N;

- Hidróxido de amônia P.A. (Merck®, Darmstad, Alemanha) diluído com água destilada até obter a concentração 3N;
- Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA);
- Éter etílico (Lafan Química Fina Ltda., Várzea Paulista, SP, Brasil);
- Diazepam, solução injetável (Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brasil), diluída em água destilada.
- Cloridrato de imipramina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dissolvido em água destilada;
- Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dissolvido em água destilada;
- Apigenina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dissolvida em água destilada para avaliação no teste de sono induzido por éter etílico ou em tampão para utilização no teste eletrofisiológico;
- Flumazenil (Tocris, Park Ellisville, MO, USA), dissolvido em solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%);
- Luteolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão para utilização no teste eletrofisiológico.

3.3.2. Análises cromatográficas

3.3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todas as amostras analisadas, solubilizadas em metanol, foram aplicadas com auxílio de capilar em placas pré-confeccionadas de gel de sílica 60F₂₅₄ (Macherey-Nagel®). O eluente utilizado foi acetato de etila:acetona:ácido acético: água (8:2:1:1, v/v/v/v). As placas foram reveladas com reagente natural A (difenilboriloxietilamina 1% em metanol), o qual quando observado sob luz UV 365 nm confere fluorescência aos flavonoides. Após a visualização dos flavonoides, as mesmas placas foram borrifadas com anisaldeído sulfúrico e aquecidas, para revelar compostos com características de saponinas e também de açúcares.

Além da análise de flavonoides, saponinas e açúcares, foi avaliada a presença de aminoácidos. Como fase fixa foi empregado gel de sílica 60F₂₅₄ (placas Macherey-Nagel®) e a fase móvel foi

butanol:ácido acético:água (12:3:5, v/v/v). O reagente cromogênico empregado na revelação das cromatoplasas foi ninhidrina.

3.3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.3.2.2.1. *Análise dos flavonoides*

As análises por CLAE foram realizadas à temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) em um equipamento Perkin Elmer® 200 equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD – 200 a 400 nm), bomba quaternária, *degasser on-line* e injetor automático. Como fase fixa foi utilizada a coluna analítica Perkin Elmer® Brownlee C₁₈ com diâmetro interno de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. O volume de injeção foi de 20 µl de cada amostra previamente solubilizada em metanol:água (1:1, v/v). A concentração das frações obtidas do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* foi de 1 mg/ml. O fluxo foi de 1,2 ml/min, utilizando um gradiente linear de acetonitrila (solvente A) e ácido fórmico 0,5% em água (solvente B). O gradiente empregado foi: 0 - 15 min, 15% - 35% A, sendo a fase móvel preparada diariamente e desgaseificada a vácuo por ultrassom (10 min) previamente ao uso. Os cromatogramas foram monitorados a 340 e 205 nm para visualização dos flavonoides e das saponinas, respectivamente e os dados obtidos foram processados no *software* Chromera® (Versão 3.2.0.4847). Os padrões utilizados foram os flavonoides glicosilados: 6,8-di-C-glicosil-crisina, isoorientina, isovitexina, vitexina-2''-O-xilosídeo, swertisina e vitexina-2''-O-ramnosídeo.

3.3.2.2.2. *Análise das saponinas*

As análises por CLAE foram realizadas à temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) em um equipamento PerkinElmer® 200 equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD – 200 a 400 nm), bomba quaternária, *degasser on-line* e injetor automático. Como fase fixa foi utilizada a coluna analítica Phenomenex® fenila Bondclone 10 (300 X 3,9 mm; 10 µm). O volume de injeção foi de 20 µl de cada amostra previamente solubilizada em metanol:água (1:1, v/v). O fluxo foi de 1,2 ml/min, utilizando como eluente misturas de acetonitrila (solvente A) e água (solvente B). O sistema empregado foi: 0 - 10 min, isocrático 20% A; 10 – 30 min, gradiente linear 20% - 35% A; e 30 – 40 min, isocrático 35% A; sendo a fase móvel preparada diariamente e desgaseificada a

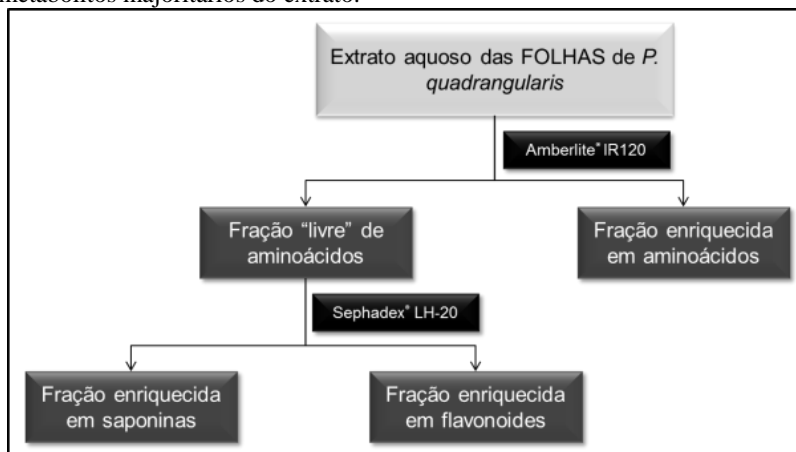
vácuo por ultrassom (10 min) previamente ao uso. Os cromatogramas foram monitorados a 340 e 205 nm para detecção dos flavonoides e das saponinas, respectivamente e os dados obtidos foram processados no *software* Chromera® (Versão 3.2.0.4847).

3.3.3. Fracionamento bioguiado do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*

3.3.3.1. Obtenção das frações enriquecidas em aminoácidos, flavonoides e saponinas

Tendo em vista a presença de aminoácidos, flavonoides e saponinas, o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* foi processado visando a separação desses componentes conforme mostrado esquematicamente na figura 3.5 e descrito abaixo.

Figura 3.5: Esquema representativo do fracionamento do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* para obtenção das frações enriquecidas nos metabólitos majoritários do extrato.



3.3.3.1.1. *Separação da fração enriquecida em aminoácidos*

O extrato foi submetido a uma coluna cromatográfica de troca iônica fortemente catiônica Amberlite® IR120. Para isso, a resina

Amberlite® IR120 (40g) foi acondicionada em uma coluna de vidro e ativada com aproximadamente 150 ml de ácido clorídrico 1N. Posteriormente, a resina foi lavada com água destilada até neutralização e uma solução do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (1g de extrato em 20 ml de água destilada) foi aplicada na coluna. Depois a solução foi reaplicada na coluna por mais duas vezes para aumentar a ligação dos aminoácidos presentes no extrato à resina acondicionada na coluna. Após, a coluna foi lavada com 300 ml de água destilada para retirar os compostos não aderidos à resina. Assim, ao final desse procedimento obteve-se uma solução do extrato “livre” de aminoácidos. A coluna cromatográfica foi então eluída com 500 ml de hidróxido de amônia 3N para reverter ligações químicas formadas entre a resina e os aminoácidos existentes no extrato e posteriormente foi lavada com água destilada até pH neutro e acondicionada com mistura de metanol:água (70:30, v/v). Ao final da coluna obteve-se uma solução aquosa do extrato “livre” de aminoácidos e uma solução amoniacal contendo grande parte dos aminoácidos presentes no extrato, as quais após serem secas em evaporador rotatório forneceram a fração “livre” de aminoácidos e a fração enriquecida em aminoácidos do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, respectivamente.

3.3.3.1.2. *Separação das frações enriquecidas em saponinas e flavonoides*

A fração “livre” de aminoácidos (150 mg) foi solubilizada em metanol e essa solução foi aplicada em uma coluna de Sephadex® LH-20 (40 g), a qual foi eluída com metanol. Sabendo-se que a separação dos compostos químicos deve-se ao peso molecular dos mesmos, foram obtidas inicialmente frações contendo majoritariamente saponinas e posteriormente frações contendo majoritariamente flavonoides. Após o agrupamento das frações e a secagem em evaporador rotatório obteve-se a fração enriquecida em saponinas e a fração enriquecida em flavonoides.

3.3.3.2. Obtenção do flavonoide majoritário do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* – vitexina-2’’-O-xilosídeo

O isolamento do flavonoide majoritário do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, vitexina-2-O-xilosídeo foi realizada pelo doutor Geison Modesti Costa (Programa de Pós-graduação em Farmácia-UFSC) durante seu estágio doutoral na Universidad Nacional

de Colombia, Bogotá, Colômbia conforme descrito em sua tese (COSTA, 2013).

3.3.4. Obtenção do flavonoide majoritário do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* - apigenina

Por ser uma substância passível de ser obtida comercialmente e cujo custo é relativamente baixo, a partição e o isolamento de apigenina a partir do extrato não foi realizada. Ou seja, a apigenina utilizada neste trabalho foi adquirida comercialmente.

3.3.5. Avaliação das atividades neurofarmacológicas

3.3.5.1. Animais

Os animais empregados no estudo dos extratos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* foram camundongos *Swiss* adultos, machos, assim como na triagem neurofarmacológica dos diversos extratos, descrita no capítulo anterior.

3.3.5.2. Avaliação da atividade sedativa

A atividade sedativa das frações e substâncias isoladas foi avaliada através do teste do sono induzido por éter etílico e pelo teste do sono induzido por pentobarbital sódico.

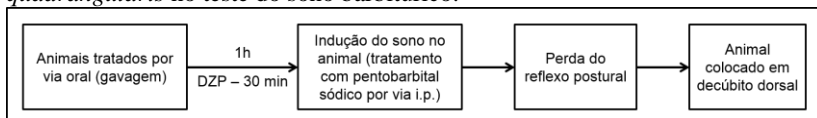
3.3.5.2.1. Teste do sono induzido por éter etílico

Todos os procedimentos relativos ao teste do sono induzido por éter etílico foram previamente descritos no capítulo 2. Nesse capítulo é apresentado o ensaio com as frações enriquecidas nos metabólitos do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (6 mg/kg) e com os flavonoides majoritários do extrato do pericarpo (apigenina - 0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/kg) e das folhas (vitexina-2''-O-xilosídeo - 0,3; 0,6; 1,0; 3,0 e 6,0 mg/kg) de *P. quadrangularis*.

3.3.5.2.2. Teste do sono induzido por pentobarbital

Na figura 3.6 é apresentado esquematicamente o delineamento experimental utilizada no teste do sono induzido por pentobarbital.

Figura 3.6: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos compostos isolados dos extratos aquosos das folhas, do pericarpo de *Passiflora quadrangularis* no teste do sono barbitúrico.



DZP = diazepam; *i.p.* = intraperitoneal.

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com os flavonoides majoritários do extrato do pericarpo (apigenina - 0,6 mg/kg) ou das folhas de *P. quadrangularis* (vitexina-2''-*O*-xilosídeo - 1,0 mg/kg). Uma hora após o tratamento com o composto teste, pentobarbital sódico (50 mg/kg) foi administrado intraperitonealmente aos camundongos. Após a perda do reflexo postural, cada animal foi colocado em decúbito dorsal para registro do tempo total de sono. A duração do sono (em min) foi avaliada (CARLINI et al., 1986), sendo o *cutoff* dez horas. Como controle positivo, foi utilizado o diazepam na dose de 1 mg/kg, administrado 30 min antes do teste, e como controle foi utilizada a água destilada (1h antes do teste), ambos administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

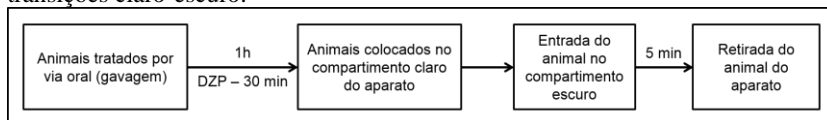
3.3.5.3. Avaliação da atividade tipo-ansiolítica

Neste trabalho foram utilizados três testes para a avaliação da atividade tipo-ansiolítica dos extratos escolhidos na triagem neurofarmacológica: teste de transições claro-escuro, teste de esconder esferas e teste do campo aberto.

3.3.5.3.1. *Teste de transições claro-escuro*

O delineamento experimental utilizado no teste de transições claro-escuro é apresentado esquematicamente na figura 3.7.

Figura 3.7: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* no teste de transições claro-escuro.



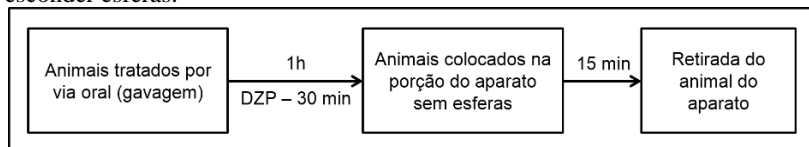
DZP = diazepam

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. O aparato é constituído de uma caixa feita de acrílico (dimensões de 45 x 27 x 27 cm) dividida em dois compartimentos, um de cor branca (2/3 do total) e outro de cor preta (1/3 do total). A parte branca foi iluminada com lâmpada incandescente de 60 W, sendo a diferença entre a luminosidade dos compartimentos de 400 lux. O animal foi colocado no compartimento claro do aparato com a cabeça voltada para a entrada que dá acesso ao compartimento escuro. Os registros foram efetuados durante 5 min após a primeira entrada do animal no lado escuro da caixa. Os parâmetros registrados foram: latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa, tempo total de permanência no compartimento claro e número de transições entre os compartimentos. Fármacos ansiolíticos (como o diazepam) podem aumentar o número de cruzamentos, assim como o tempo de permanência na parte clara da caixa, além da latência para passagem para o lado escuro (COSTALL et al., 1989). Como controle positivo foi utilizado o diazepam (2,5 mg/kg) administrado 30 min antes do teste e como controle foi utilizada água destilada (1h antes do teste), ambos administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

3.3.5.3.2. *Teste de esconder esferas*

Os procedimentos utilizados no teste de esconder esferas são mostrados esquematicamente na figura 3.8.

Figura 3.8: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* no teste de esconder esferas.



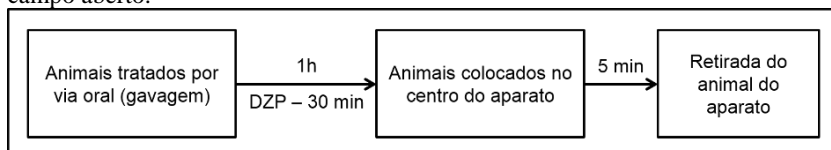
DZP = diazepam.

Os animais foram inicialmente tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. O aparato consiste em uma caixa de vidro medindo 38 x 31 x 20 cm, forrada com serragem (aproximadamente 3,0 cm de altura). Sobre a serragem dispôs-se 25 esferas de vidro em 5 fileiras de 5 esferas cada em um retângulo de aproximadamente 30 x 31 cm, restando um retângulo menor (8 x 31 cm) em uma das partes da caixa sem esferas, local onde o animal foi colocado no aparato. Para que o ambiente ficasse ainda mais aversivo, o aparato foi iluminado com uma lâmpada incandescente de 150 W posicionada logo acima da caixa, proporcionando uma luminosidade de 960 Lux. Após 15 min do início do teste, o animal foi retirado e o número de esferas escondidas foi o parâmetro utilizado para a análise do comportamento do animal (adaptado de NJUNG'E; HANDLEY), 1991. Como controle positivo, foi utilizado diazepam (2,5 mg/kg) administrado 30 min antes do teste, e como controle foi utilizada água destilada (1h antes do teste), ambos administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

3.3.5.3.3. *Teste do campo aberto*

Na figura 3.9 encontra-se um esquema representativo do delineamento experimental utilizado no teste do campo aberto.

Figura 3.9: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* no teste do campo aberto.



DZP = diazepam.

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com os extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. O aparato consiste em uma caixa de 50 x 50 cm, confeccionada em acrílico transparente e com o chão encapado com papel Contact® cinza escuro com o objetivo de causar contraste entre o fundo do aparato e o animal e facilitar a posterior avaliação dos parâmetros no programa ANY-MAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Com o objetivo de promover maior aversividade o aparato foi iluminado com 30 Lux. Após serem colocados individualmente no centro do campo aberto, sempre com a cabeça voltada para o mesmo lado da caixa, os animais permaneceram no aparato durante 5 min. Foram avaliados os parâmetros relacionados à atividade motora (distância percorrida pelo animal, velocidade média e o comportamento de levantar-se), bem como os relacionados à atividade tipo-sedativa (tempo total que o animal permaneceu no centro e na periferia da caixa e número de entradas do animal no centro da caixa) (SIEGEL, 1946; ARCHER, 1973; PRUT; BELZUNG, 2003). Assim, um maior tempo de permanência e entradas no centro revela uma atividade do tipo ansiolítica e mudanças na distância percorrida, na velocidade e comportamento de levantar-se indicam atividade estimulante ou sedativa. Como controle positivo, foi utilizado diazepam (2,0 mg/kg) administrado 30 min antes do teste e como controle foi utilizada água destilada (1h antes do teste), ambos administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

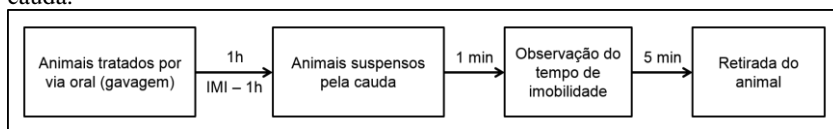
3.3.5.4. Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

A avaliação da atividade tipo-antidepressiva para o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* foi realizada pelo teste de suspensão pela cauda em camundongos.

3.3.5.4.1. *Teste de suspensão pela cauda*

Os procedimentos apresentados na figura 3.10 foram utilizados no teste de suspensão pela cauda.

Figura 3.10: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* no teste de suspensão pela cauda.



IMI = cloridrato de imipramina.

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. Uma hora após o tratamento os animais foram fixados pela cauda, com o auxílio de fita adesiva, na bancada de experimentação, a uma altura de 70 cm do solo. Após a fixação, os animais ficaram suspensos durante 6 min., sendo que o primeiro minuto de observação foi descartado. Ou seja, os animais foram observados individualmente durante 5 min, sendo registrado o tempo total de imobilidade, em segundos. Os antidepressivos utilizados na clínica diminuem o tempo de imobilidade dos animais neste teste (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Como controle positivo, foi utilizado cloridrato de imipramina (45 mg/kg) e, como controle foi utilizada água destilada, ambos administrados 1h antes do teste por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

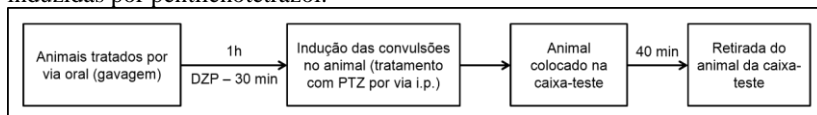
3.3.5.5. Avaliação da atividade anticonvulsivante

O efeito anticonvulsivante de extratos provenientes de *P. incarnata* foi previamente relatado. Neste contexto, essa atividade foi avaliada para o extrato escolhido na triagem neurofarmacológica pelo teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol e eletrochoque transcorneal máximo.

3.3.5.5.1. *Teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol*

O delineamento experimental utilizado nesse teste é apresentado esquematicamente na figura 3.11.

Figura 3.11: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.



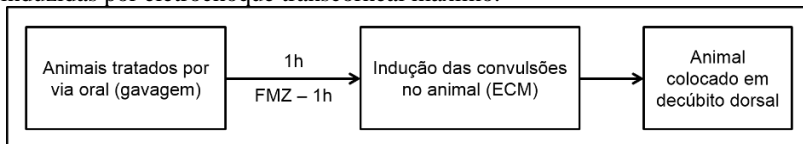
DZP = diazepam; PTZ = pentilenotetrazol; *i.p.* = intraperitoneal.

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. Uma hora após o tratamento, no momento do teste, os animais foram tratados por via intraperitoneal com pentilenotetrazol na dose de 80 mg/kg com o intuito de induzir as convulsões. Imediatamente após o tratamento com pentilenotetrazol, os animais foram colocados em uma caixa de observação por 40 min., onde os seguintes parâmetros foram registrados: latência para a ocorrência da primeira convulsão clônica, duração desta convulsão, tempo para ocorrência do óbito do animal e severidade das convulsões, avaliada por meio de escores já estabelecidos por nosso grupo de pesquisa (1= abalo mioclônico; 2= convulsão clônica sem perda do reflexo postural; 3= convulsão clônica com perda do reflexo postural; 4= convulsão tônica sem morte, e 5= convulsão tônica seguida de morte (DUARTE et al., 2007; CZUCZWAR; FREY, 1986). Compostos que aumentam a latência para a primeira convulsão ou impedem essas convulsões e/ou diminuem a duração ou a letalidade das mesmas correlacionam-se positivamente com os fármacos usados no tratamento das epilepsias do tipo crise de ausência em humanos (SWINYARD et al., 1952). Como controle positivo, foi utilizado diazepam (3,0 mg/kg) administrado 30 min antes do teste e como controle foi utilizada água destilada (1h antes do teste), ambos administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

3.3.5.5.2. Teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo

Na figura 3.12 é representado esquematicamente o delineamento experimental utilizado no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo.

Figura 3.12: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo.



FMZ = flumazenil; ECM = eletrochoque transcorneal máximo.

Os animais foram tratados por via oral, com auxílio de cânula intragástrica (0,1 ml/10 g), com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg. O teste experimental consistiu na aplicação de um eletrochoque (60 Hz; 50 mA; 0,2 s) diretamente nos olhos do animal previamente umedecidos com soro fisiológico, uma hora após o tratamento com os compostos teste. Imediatamente após o choque, os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal e foram observados durante o tempo transcorrido até a sua completa recuperação ou possível letalidade (SWINYARD et al., 1952) (Fig. 3.10). Dois parâmetros foram observados: a duração da extensão tônica, que corresponde ao tempo decorrido desde o início da extensão das patas posteriores até o completo relaxamento das mesmas; e a porcentagem de animais que apresentaram extensão tônica. De maneira geral, substâncias anticonvulsivantes capazes de proteger os animais nesse teste reduzem esses dois parâmetros (SWINYARD et al., 1952). Como controle positivo, foi utilizada a fenitoína (10,0 mg/kg) que assim como o controle (água destilada) foi administrada uma hora antes do teste. Todos os controles foram administrados por via oral com auxílio de cânula intragástrica.

3.3.6. Avaliação do envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa dos flavonoides majoritários dos extratos de *P. quadrangularis*

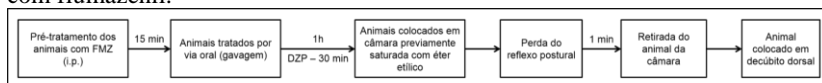
O envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa dos compostos majoritários dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* foi avaliado através da realização do teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento dos animais com flumazenil (teste *in vivo*) e de testes eletrofisiológicos do tipo *voltage clamp* (testes *in vitro*).

3.3.6.1. Teste do sono induzido por éter etílico após administração de flumazenil

Ensaios prévios, em nosso laboratório, mostraram que a dose de 1 mg/kg, *i.p.* de flumazenil, foi eficiente em antagonizar a atividade sedativa do DZP.

O protocolo utilizado nesse teste é mostrado esquematicamente na figura 3.13.

Figura 3.13: Delineamento experimental utilizado na investigação do efeito dos compostos isolados dos extratos aquosos das folhas e do pericarpo de *P. quadrangularis* no teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil.



FMZ = flumazenil; DZP = diazepam; *i.p.* = intraperitoneal.

Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com o FMZ (1,0 mg/kg) ou solução salina e, 15 min depois, foram tratados por via oral com o veículo ou DZP ou os flavonoides majoritários dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis*, sendo elas a apigenina (0,6 mg/kg) e a vitexina-2''-O-xilosídeo (1,0 mg/kg), respectivamente. Os animais foram submetidos ao teste do sono induzido por éter etílico 1h após a administração (*v.o.*) dos compostos teste ou do veículo e 30 min após DZP.

3.3.6.2. Teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp*

Para realização do teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* foram utilizados como células oócitos de *Xenopus laevis* no estágio V-VI de maturação. Para isso, fêmeas de *X. laevis* (NASCOTM, Fort Atkinson, EUA) foram anestesiadas por exposição a uma solução 0,2% de metanossulfonato de tricáína (MS-222) por 15 min. Com as fêmeas anestesiadas, partes dos ovários foram cirurgicamente removidas. As membranas foliculares dos oócitos foi digerida com solução 2 mg/ml de colagenase (tipo 1A) liberando, assim, os oócitos isolados os quais

foram selecionados manualmente com auxílio de lupa e injetados com aproximadamente 10-50 nl de água tratada com pirocarbonato dietílico (DEPC) contendo os cRNAs de interesse na concentração aproximada de 300–3000 pg/nl. A quantidade de cRNA foi determinada através do equipamento NanoDrop ND-1000® (KiskerbiotechTM, Steinfurt, Alemanha). Para garantir a mesma expressão da subunidade gama encontrada em receptores GABAérgicos tipo A de ratos, cRNAs para expressão de receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ foram misturados na razão 1:1:10, respectivamente. Após a injeção, os oócitos foram estocados a $18 \pm 8^\circ\text{C}$ por 24–48 h em solução ND96 contendo penicilina G (10000 IU/100 ml) e estreptomicina (10 mg/100 ml), sendo a solução ND96 composta por 4,8 mM de cloreto de sódio, 0,1 mM de cloreto de cloreto de potássio, 0,05 mM de cloreto de magnésio hexahidratado, 0,25 mM de HEPES e 1,8 mM de cloreto de cálcio dihidratado (pH 7,4).

A técnica empregada nos experimentos eletrofisiológicos em receptores GABA_A foi o método de *voltage clamp* com dois microeletrodos em potencial de -70 mV, utilizando um amplificador TURBO TEC 01 C® (npi electronicTM, Tamm, Alemanha) e interface Axon Digidata 1322A (Molecular DevicesTM, Sunnyvale, CA). A aquisição dos dados deu-se através do *software* pCLAMP v.9.2. A solução tampão utilizada no momento da aquisição dos dados foi ND96 e os microeletrodos foram preenchidos com solução de cloreto de potássio 3M.

O GABA e os compostos teste foram aplicados através de um sistema de perfusão rápido (ScreeningTool®, *npi electronic*®, Tamm, Alemanha) (BABURIN et al., 2006), buscando-se avaliar a modulação da corrente elétrica induzida por GABA (I_{GABA}). Para induzir I_{GABA} , a câmara receptora dos oócitos expressando os receptores GABA foi perfundida com 120 μl de solução contendo GABA em uma razão de volume entre 300 e 1000 $\mu\text{l/s}$. O tempo de aumento de I_{GABA} variou de 100 a 250 ms (KHOM et al. 2006). Buscando excluir erros, oócitos com amplitude de corrente máxima acima de 3 mA foram descartados.

A potencialização de I_{GABA} em percentual foi definida de acordo com a fórmula: $I_{\text{GABA}} (\%) = [I_{(\text{GABA} + \text{composto})}/I_{\text{GABA}} - 1] \times 100$, onde I_{GABA} é a corrente de cloreto induzida pelo controle GABA e $I_{(\text{GABA} + \text{composto})}$ é a corrente resposta na presença de diferentes concentrações dos compostos teste e GABA. Os dados obtidos foram representados como média \pm e.p.m. das correntes observadas de oócitos (≥ 3) de pelo menos 2 animais diferentes e analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey's, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

3.3.7. Análise estatística

Os dados paramétricos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.), como mediana \pm intervalo interquartil, quando os dados foram não paramétricos ou ainda como porcentagem. Quando as variáveis eram paramétricas, as comparações estatísticas dos grupos tratados com o controle foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida do teste *post-hoc* de Dunnett. Entre os grupos controle e controle positivo foi realizado o teste *t* de Student não pareado. Já, quando as variáveis eram não-paramétricas os grupos tratados foram comparados ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's das comparações múltiplas. O grupo controle positivo foi comparado ao grupo controle pelo teste *U* de Mann-Whitney. Ainda os dados representados como porcentagem foram analisados pelo teste de probabilidade exata de Fisher. Em todos os casos, a probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p \leq 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico Prisma GraphPad® 5.0 e/ou Statistica® 7.0 e/ou Origin® 7.0. Os *outliers* foram retirados do resultado final após serem reconhecidos no teste de Grubbs (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA⁴).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Estudo do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*

Com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* foram realizados outros testes neurofarmacológicos: avaliação da atividade tipo-ansiolítica, tipo-antidepressiva e anticonvulsivante. Deve-se salientar que não foram encontrados na literatura estudos acerca das atividades farmacológicas do pericarpo dessa espécie.

3.4.1.1. Avaliação da atividade tipo-ansiolítica

⁴ Disponível em: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>.

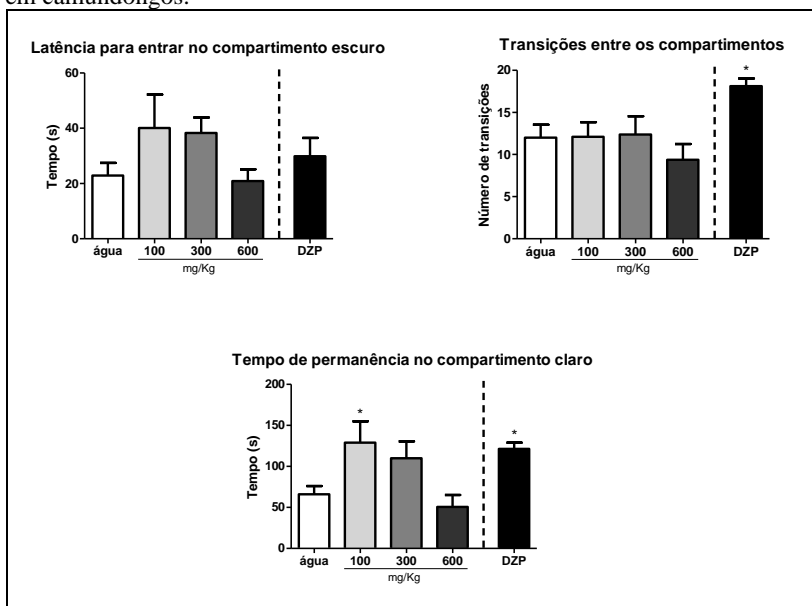
A avaliação da atividade tipo-ansiolítica foi realizada no presente estudo utilizando-se três testes distintos, sendo eles: teste de transições claro-escuro, teste do campo aberto e teste de esconder esferas.

3.4.1.1.1. Teste de transições claro-escuro

O teste de transições claro-escuro foi inicialmente proposto por Crawley e Goodwin, em 1980, e foi desenvolvido com base na aversão inata de roedores por áreas altamente iluminadas e no fato deles possuírem um comportamento espontâneo de exploração de ambientes novos (HASCÖET et al., 2001). Dessa forma, substâncias ansiolíticas (como o diazepam) tendem a aumentar o tempo de permanência do animal no compartimento branco, maior e iluminado do aparato, bem como podem aumentar o número de transições entre os compartimentos (BORIN; HASCÖT, 2003).

Como pode ser observado na figura 3.14, o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* aumentou o tempo de permanência do animal no compartimento claro do aparato, o que sugere uma atividade tipo-ansiolítica desse extrato na dose de 100 mg/kg [$F(3,32)= 3,686$; $p=0,0219$].

Figura 3.14: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de transições claro-escuro em camundongos.



O diazepam (DZP) (2,5 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8-10$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

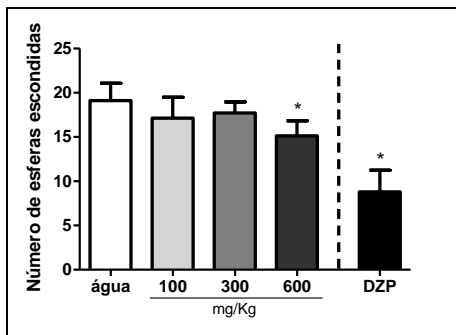
3.4.1.1.2. Teste de esconder esferas

O teste de esconder esferas foi inicialmente proposto por Treit e colaboradores (1981). Os autores observaram que fármacos como o diazepam eram capazes de diminuir a propensão dos animais em esconder fontes aversivas, predizendo assim possíveis fármacos ansiolíticos. Porém, atualmente, muitos autores estão utilizando esse teste não apenas na busca de fármacos ansiolíticos, como para detectar substâncias utilizadas especificamente no transtorno obsessivo-compulsivo (LONDEI; VALENTINI; LEONE, 1998; BOER; KOOLHAAS, 2003; ALBELDA; JOEL, 2012).

Ao observar os resultados obtidos nesse teste (Fig. 3.15), verifica-se que o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* na dose de

600 mg/kg [$F(3,28)= 6,418$; $p=0,0019$] reduziu o número de esferas escondidas quando comparado ao grupo controle (água). Esse mesmo padrão de comportamento foi também observado nos grupos controle positivo (diazepam).

Figura 3.15: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de esconder esferas em camundongos.



O diazepam (DZP) (2,5 mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-10$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. $*p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Dessa forma, é possível sugerir que esse extrato apresenta não apenas atividade tipo-ansiolítica, relacionada ao distúrbio de ansiedade generalizada, observada no teste de transições claro-escuro, como é possível que tenha propriedades terapêuticas úteis no transtorno obsessivo-compulsivo, um distúrbio de ansiedade específico (APA, 2014).

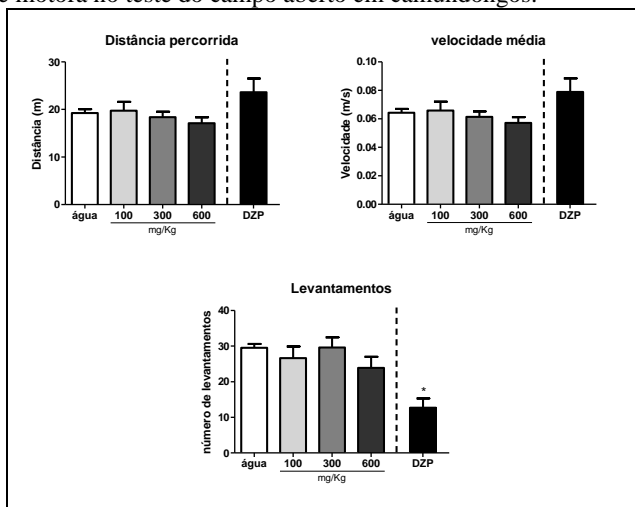
3.4.1.1.3. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto permite verificar possível atividade estimulante ou sedativa de um composto, as quais são observadas pelos parâmetros locomotores (SIEGEL, 1946; ARCHER, 1973), além de avaliar também possíveis alterações sobre os parâmetros de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Nesse sentido, o teste do campo aberto foi utilizado no presente trabalho como forma de verificar possíveis alterações motoras causadas pelos tratamentos com os extratos (evitando assim resultados falso-positivos no teste de transições claro-escuro e

esconder esferas), bem como um teste complementar da atividade tipo-ansiolítica.

Avaliando-se os parâmetros locomotores (Fig. 3.16) é possível verificar que o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg, não alterou o comportamento dos animais, quando comparados aos animais do grupo controle. Dessa forma, os resultados obtidos nos testes para avaliação de atividade ansiolítica, descritos acima, não podem ser considerados como possíveis resultados falso-positivos, tendo em vista que não ocorreu um prejuízo locomotor (o que seria um indicativo de atividade sedativa *per se*). Ainda, correlacionando esse dado com o aumento do tempo de duração do sono observado no teste do sono induzido por éter etílico (capítulo 2), supõe-se que esse extrato não apresenta atividade sedativa *per se*, ou seja, provavelmente ele atua apenas potencializando a atividade sedativa de outros compostos hipnóticos (éter e pentobarbital, como o fazem outros depressores do SNC).

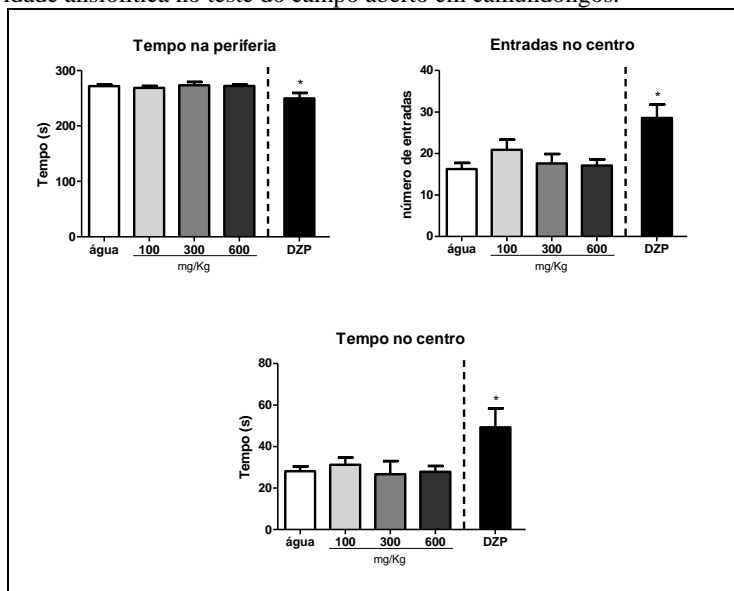
Figura 3.16: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade motora no teste do campo aberto em camundongos.



O diazepam (DZP) (2,0 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Verificando os parâmetros relacionados com a atividade tipo-ansiolítica, o extrato não demonstrou nenhuma modificação nas doses avaliadas nesse teste, quando comparado ao controle (Fig. 3.17). Esse resultado não exclui a possibilidade de uma atividade tipo-ansiolítica, a qual foi observada nos testes de transição claro-escuro e de esconder esferas descritos acima. Isso porque, segundo Prut e Belzung (2003), o tempo de permanência do animal no centro do aparato (um dos parâmetros utilizados para avaliar a atividade tipo-ansiolítica no teste do campo aberto) é geralmente sensível à administração aguda de fármacos ansiolíticos que atuam na via GABA (como é o caso dos benzodiazepínicos). Desta forma, é possível, que a atividade tipo-ansiolítica do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* não seja observada nesse teste devido a um mecanismo de ação diferente de seu(s) constituinte(s) ativo(s).

Figura 3.17: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade ansiolítica no teste do campo aberto em camundongos.



O diazepam (DZP) (2,0 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

3.4.1.2. Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

A avaliação da atividade tipo-antidepressiva do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* foi realizada através do teste de suspensão pela cauda tendo em vista que essa atividade já foi observada para outras espécies de *Passiflora*, como no caso do extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* f. *flavicarpa* (SENA, 2009) e para o extrato metanólico das folhas de *P. foetida* (SANTOSH et al., 2011).

3.4.1.2.1. Teste de suspensão pela cauda

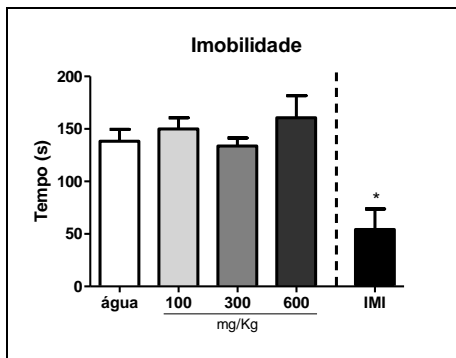
O teste da suspensão pela cauda é um teste utilizado para a avaliação e identificação de novos compostos com ação central do tipo-antidepressiva (BOURIN et al., 2005; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Este teste foi proposto por Stéru e colaboradores (1985) e baseia-se no fato de que roedores, após o comportamento inicial de tentar escapar, desenvolvem uma postura de imobilidade quando colocados em uma situação de estresse inescapável. Normalmente, fármacos antidepressivos utilizados na clínica (como a imipramina) aumentam o tempo em que os animais realizam comportamentos direcionados ao escape, diminuindo, consequentemente, o tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda. Sendo assim, substâncias que reduzem o tempo de imobilidade em camundongos indicam atividade tipo-antidepressiva (STÉRU et al., 1985; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

Esse teste, utilizado como uma alternativa ao teste do nado forçado para o estudo de compostos com possível atividade do tipo-antidepressiva, apresenta algumas vantagens: o teste de suspensão pela cauda detecta os efeitos de substâncias independentemente de seus mecanismos de ação, enquanto o teste do nado forçado não tem se mostrado tão eficaz na detecção da atividade de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, embora exista certa polêmica a esse respeito (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; JACOBSON; CRYAN, 2007). Como no presente trabalho estamos utilizando compostos cujos mecanismos de ação não são conhecidos, o teste de suspensão pela cauda foi considerado o mais adequado para a investigação da atividade tipo-antidepressiva.

O extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* não modificou o tempo de imobilidade do animal quando comparado ao grupo controle nas doses testadas (Fig. 3.18). Ou seja, esse extrato não

apresentou atividade tipo-antidepressiva nesse teste, ao contrário do observado para o extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* f. *flavicarpa* (SENA, 2009).

Figura 3.18: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda em camundongos.



O cloridrato de imipramina (IMI) (45mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. n = 6-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

3.4.1.3. Avaliação da atividade anticonvulsivante

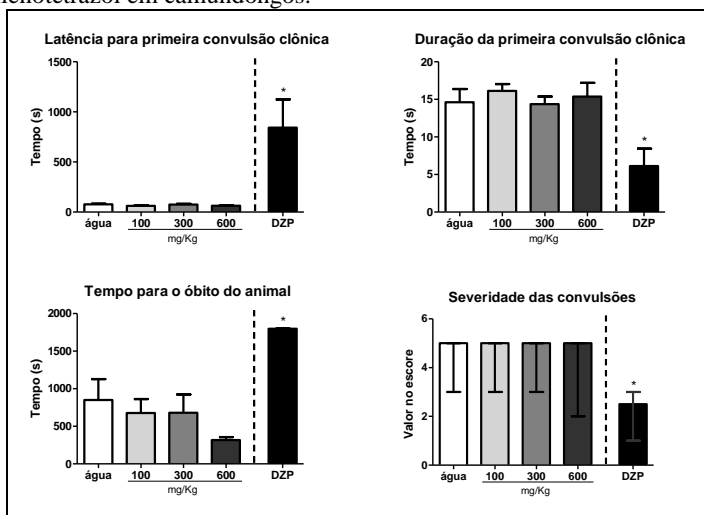
Levando-se em consideração observações prévias de outros autores acerca da atividade anticonvulsivante de extratos de *P. alata* (OGA et al., 1984), *P. foetida* (PAVAN et al., 2009) e *P. incarnata* (SPERONI; MINGHETTI, 1988; SPERONI et al., 1996a; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2003; NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007; NASSIRI-ASL; ZAMANSOLTANI; SHARIATI-RAD, 2008; ELSAS et al., 2010), essa atividade foi avaliada para o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* pelo teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol e por eletrochoque transcorneal máximo.

3.4.1.3.1. *Teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol*

O teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) é um teste amplamente utilizado na busca de compostos anticonvulsivantes, indicativo de substâncias efetivas nas crises convulsivas generalizadas do tipo ‘pequeno mal’ (crise de ausência) (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988).

Após a realização do teste com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg, verificou-se que o mesmo não modificou nenhum dos parâmetros avaliados. O contrário ocorreu para o grupo controle tratado com diazepam, como esperado (Fig. 3.19).

Figura 3.19: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos.



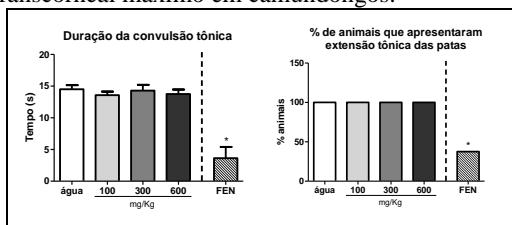
O diazepam (DZP) (3,0mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam nos parâmetros latência para primeira convulsão clônica, duração da primeira convulsão clônica e tempo para o óbito do animal. O teste de Kruskal-Wallis; teste U de Mann Whitney foi utilizado para os dados do diazepam para o parâmetro severidade das convulsões).

3.4.1.3.2. Teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo

Tendo em vista que o teste de convulsões induzidas por PTZ (descrito acima) é capaz de fazer a triagem de substâncias efetivas nas crises do tipo ausência em humanos (SWINYARD et al., 1952), a realização de outro teste comportamental para ampliar a investigação da atividade anticonvulsivante fez-se necessária. Foi feito então o teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo (ECM). Esse é um teste validado para a busca de substâncias efetivas nas crises tônico-clônicas generalizadas ('grande mal') (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988).

Pode-se observar pelos resultados apresentados na figura 3.20 que o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* não protegeu os animais das convulsões induzidas pelo ECM. O controle positivo utilizado, fenitoína, como esperado, além de diminuir o tempo de duração das convulsões tônicas induzidas nos animais também reduziu o número de animais que apresentaram extensão tônica das patas. Esse resultado está de acordo com o relatado na literatura, já que segundo Kupferberg (2001) a fenitoína, um fármaco utilizado no tratamento de crises tônico-clônicas generalizadas, causando proteção do SNC aos animais neste teste devido ao seu mecanismo de ação (bloqueio dos canais de sódio) ser diferente do diazepam, que é inativo neste teste.

Figura 3.20: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo em camundongos.



A fenitoína (FEN) (10,0 mg/kg, v.o.) foi utilizada como fármaco padrão. n = 7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam para o parâmetro duração da convulsão tônica. O teste de probabilidade exata de Fisher foi usado para o parâmetro % de animais que apresentaram extensão tônica das patas).

3.4.1.4. Avaliação da composição química do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*

A análise prévia dos extratos em estudo (capítulo 2) indicou a presença de flavonoides, sendo a apigenina predominante com um teor de cerca de 2,5 mg/g do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*. A análise buscando identificar a presença de outros compostos, como terpenos, saponinas, entre outros, indicou apenas a presença de açúcares (resultados não apresentados).

Tendo em vista que a composição química do extrato proveniente do pericarpo da espécie é predominantemente composta por açúcares e em menor escala por flavonoides, e que estudos prévios já demonstraram a atividade sedativa dos flavonoides (MARDER et al., 2003; COLETA et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2009; CARVALHO; DUARTE; LIMA, 2011), optou-se por avaliar a atividade sedativa do flavonoide majoritário desse extrato, a apigenina.

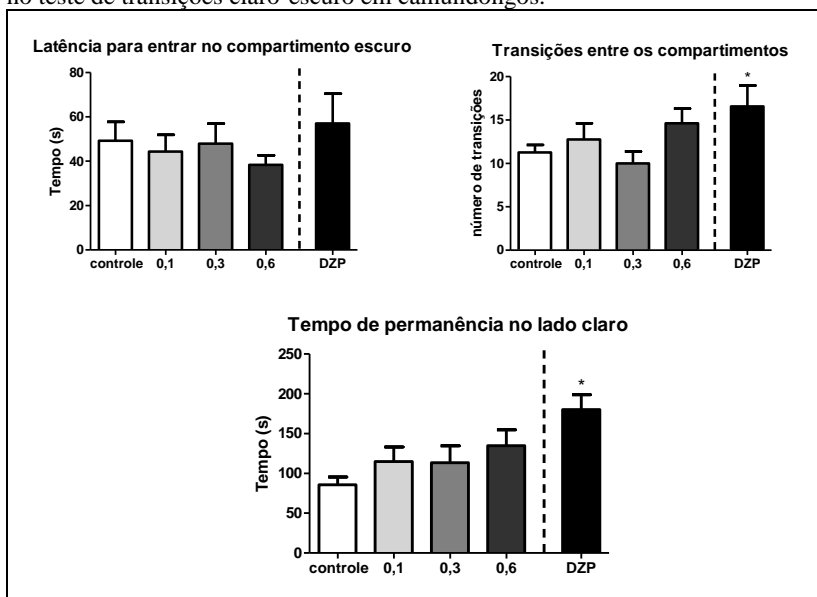
3.4.1.5. Avaliação das atividades tipo-ansiolítica e sedativa da apigenina *in vivo*

A estimativa das doses de apigenina a serem testadas foi realizada levando-se em consideração à quantidade de apigenina presente no extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (2,449 mg de apigenina por grama de extrato – capítulo 2) e as doses efetivas do extrato nesses testes (atividade sedativa – item 2.4.1.5; atividade tipo-ansiolítica – item 3.4.1.1). A dose de 100 mg/kg do extrato corresponde à administração de 0,2449 mg/kg de apigenina e 300 mg/kg do extrato equivale, portanto, à dose de 0,7347 mg/kg dessa substância. Desta forma, as doses escolhidas para serem testadas foram: 0,1; 0,3; 0,6 e/ou 1,0 mg/kg.

3.4.1.5.1. *Avaliação da atividade tipo-ansiolítica pelo teste de transições claro-escuro da apigenina*

Conforme pode ser verificado na figura 3.21, a apigenina, administrada por via oral nas doses de 0,1; 0,3 e 0,6 mg/kg, não promoveu nenhum efeito significativo nos parâmetros analisados.

Figura 3.21: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (0,1, 0,3 e 0,6 mg/kg) no teste de transições claro-escuro em camundongos.

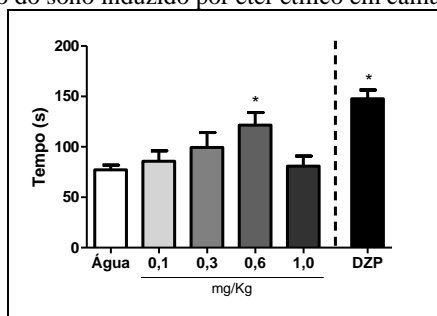


O diazepam (DZP) (2,5 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

3.4.1.5.2. Avaliação da atividade sedativa da apigenina pelos testes de sono induzido por éter etílico e por pentobarbital

Na figura 3.22 são apresentados os resultados obtidos para a apigenina no teste do sono induzido por éter etílico. Essa substância na dose de 0,6 mg/kg aumentou o tempo de duração do sono nos animais quando comparado aos animais do grupo controle [$F(4,35) = 2.657$; $p = 0,0490$], indicando atividade sedativa.

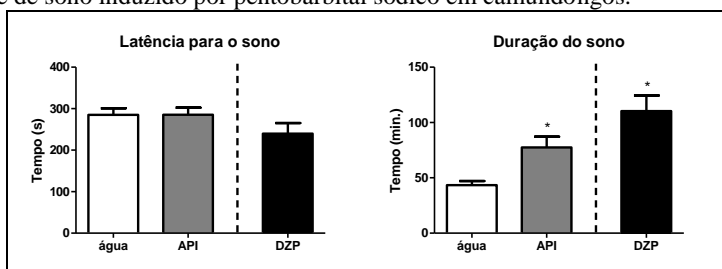
Figura 3.22: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Buscando confirmar o resultado obtido no teste do sono induzido por éter etílico, a apigenina foi também testada em um dos testes mais utilizados na avaliação da atividade sedativa de compostos, o teste do sono barbitúrico. No teste do sono barbitúrico ficou evidente que a apigenina, na mesma dose ativa observada no teste do sono induzido por éter etílico (0,6 mg/kg), aumentou a duração do sono em camundongos (Fig. 3.23)

Figura 3.23: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (API) (0,6 mg/kg) no teste de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

A atividade sedativa da apigenina não é uma novidade, pois já foi descrita anteriormente, embora não nos testes aqui usados. Zanolí e colaboradores (2000) e Avallone e colaboradores (2000) observaram a atividade sedativa dessa substância no teste do campo aberto, quando administrada *i.p.* em ratos das doses de 25, 50 e 100 mg/kg e 25 e 50 mg/kg, respectivamente. Outro estudo, realizado com a administração oral de apigenina em camundongos C57BL/6J, descreve essa atividade na dose de 1,5 mg/kg avaliada pelo teste da telemetria (CHOW et al., 2011).

3.4.1.6. Avaliação do envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa da apigenina

Ao se fazer referência à atividade sedativa de determinado composto deve-se lembrar que essa atividade está diretamente relacionada à depressão do SNC que esse composto é capaz de provocar. Nesse sentido, existem algumas vias neuronais capazes de deprimirem o SNC e, dentre elas, pode-se citar a via GABAérgica como uma das mais influentes, sendo por isso o mecanismo de ação mais comum entre os fármacos sedativos atualmente disponíveis no mercado como os benzodiazepínicos (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2011).

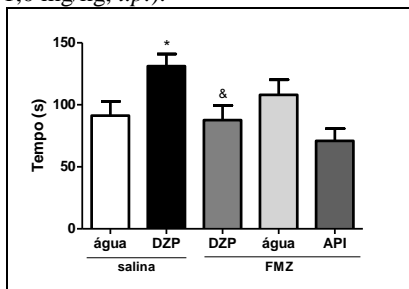
3.4.1.6.1. Teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil

O flumazenil (FMZ) é um antagonista benzodiazepínico específico que se liga com alta afinidade ao receptor GABA_A, competindo com os benzodiazepínicos pelo seu sítio de ligação, além de promover efeitos alostéricos (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2011). Buscando avaliar a influência *in vivo* da via GABAérgica na atividade sedativa de apigenina, o teste do sono induzido por éter etílico foi utilizado em camundongos que, previamente a administração por via oral dos controles e compostos teste, receberam flumazenil.

Como é possível verificar na figura 3.24 a administração de FMZ, 15 min antes da administração oral de DZP, preveniu o aumento na duração do sono dos animais, quando comparado ao grupo de animais que receberam DZP após pré-tratamento com solução salina, o que comprova a eficácia do FMZ como antagonista benzodiazepínico nesse teste. Com relação à apigenina (0,6 mg/kg), a pré-administração (*i.p.*) de FMZ impediu o aumento da duração do sono anteriormente observado

(Figs. 3.22 e 3.23), o que indica que os receptores GABA_A, mais especificamente através de seus sítios benzodiazepínicos, exercem importante efeito na atividade sedativa desse flavonoide.

Figura 3.24: Efeitos do tratamento oral com a apigenina (API - 0,6 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos pré-tratados com flumazenil (FMZ - 1,0 mg/kg, *i.p.*).



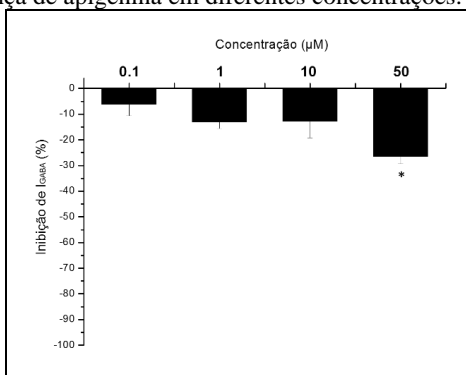
O diazepam (DZP - 1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * e & indicam que $p \leq 0.05$ comparado com grupos: salina/água e salina/DZP, respectivamente (teste ANOVA de duas vias seguido por teste Newman-Keuls).

3.4.1.6.2. Teste eletrofisiológico do tipo 'voltage clamp'

Levando em consideração o resultado *in vivo* que demonstrou o envolvimento dos receptores GABA-benzodiazepínicos no mecanismo de ação sedativa de apigenina, realizou-se um teste eletrofisiológico *in vitro* buscando avaliar o potencial de apigenina em evocar correntes elétricas mediadas pelo influxo de cloreto a partir da ativação de receptores GABA_A do subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$. Foram escolhidos receptores com essas subunidades, pois a literatura mostra que esse é o subtipo de receptor GABA_A mais comumente envolvido na atividade sedativa de compostos (MCKERNAN et al, 2000).

Na figura 3.25 estão apresentados os resultados obtidos no teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* realizado com apigenina. Nele é possível verificar que, ao invés de aumentar as correntes de cloreto, esse flavonoide as inibiu na dose mais elevada testada, o que vai contra os resultados obtidos *in vivo* no teste do sono induzido por éter etílico após a administração de flumazenil.

Figura 3.25: Modulação da corrente de cloreto induzida pelo controle GABA (I_{GABA}) na presença de apigenina em diferentes concentrações.



Receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ s. Concentrações de GABA capazes de induzir 3–7% da resposta máxima (EC_{3-7}). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 3 oócitos de, pelo menos, duas fêmeas de *X. laevis* diferentes.

Resultados semelhantes a esse foram previamente descritos por Losi e colaboradores (2004), que observaram, através da técnica *patch clamp*, que apigenina reduziu as correntes mediadas por receptores GABA tipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ em células HEK293. Nesse mesmo sentido, Avallone e colaboradores (2000) demonstraram que a apigenina liga-se aos sítios benzodiazepínicos centrais, pois foi capaz de deslocar o radioligante específico [3H]Ro 15-1788 com baixa afinidade, porém também reduziu as correntes de cloreto relacionadas aos receptores GABA em cultura de células granulares do cerebelo, avaliadas por *patch clamp*.

Levando em consideração os resultados obtidos e o observado na literatura fica implícito que, apesar da apigenina ativar os receptores GABA_A -benzodiazepínicos *in vivo*, produzindo sedação nos animais, isso não ocorre através do influxo intracelular de cloreto pela abertura desses canais. Nesse sentido, três hipóteses foram formuladas:

- 1) Estariam os metabólitos de apigenina formados *in vivo* relacionados ao aumento da corrente de cloreto relacionada aos receptores GABA_A érgicos?
- 2) Seria o efeito sedativo da apigenina relacionado à via GABA_A érgica, porém em receptores GABA_A de um subtipo diferente ao $\alpha_1\beta_2\gamma_2$?
- 3) A apigenina poderia atuar como modulador de segunda ordem?

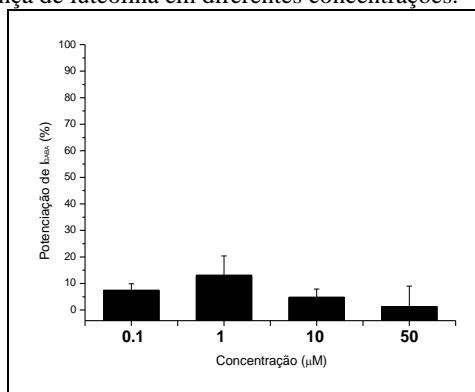
No sentido da segunda hipótese, já foi demonstrado, por exemplo, a influência da subunidade α_5 na atividade sedativa de compostos (SAVIĆ et al., 2008), ou seja, para responder à essa segunda hipótese

faz-se necessário um estudo amplo e aprofundado apenas nas possíveis interações de apigenina com os diversos subtipos de receptores GABA.

No tocante à terceira hipótese, estudos anteriores demonstraram que a apigenina quando aplicada sozinha ao receptor no teste de *voltage clamp* de dois eletrodos não modula I_{GABA} ; no entanto, apresenta forte efeito quando coaplicada com outro modulador do receptor do GABA_A, tal qual o diazepam (CAMPBELL et al., 2004). Essa observação na literatura reitera o comentado no parágrafo anterior onde se especula a necessidade de um estudo mais aprofundado na interação da apigenina com a via GABAérgica.

Assim, neste trabalho, iniciamos a verificação da primeira hipótese. Na literatura é descrito que um dos principais metabólitos da apigenina formado *in vitro* em cultura de células de fígado é a luteolina (GRADOLATTO et al., 2004), uma forma hidroxilada da apigenina (estruturas químicas disponíveis no apêndice A). A luteolina foi submetida ao teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* e demonstrou que, ao contrário de seu precursor apigenina, não é capaz de inibir as correntes de cloreto relacionadas à ativação dos receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (I_{GABA}) (Fig. 3.26).

Figura 3.26: Modulação da corrente de cloreto induzida pelo controle GABA (I_{GABA}) na presença de luteolina em diferentes concentrações.



Receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ s. Concentrações de GABA capazes de induzir 3–7% da resposta máxima (EC_{3-7}). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 3 oócitos de, pelo menos, duas fêmeas de *X. laevis* diferentes.

Apesar de não ser um resultado estatisticamente significativo, a luteolina mostrou uma pequena potencialização de I_{GABA} , o que não seria capaz de deprimir o SNC, porém esse experimento indica a

importância do estudo dos metabólitos de apigenina na ativação dos receptores GABA_A.

Ainda, levando em consideração esse resultado, pode-se sugerir que além da via GABAérgica haja o envolvimento de outra via neuronal e é nesse sentido que o trabalho de Losi e colaboradores (2004) também aponta. No referido trabalho, os autores demonstraram, em experimentos eletrofisiológicos do tipo *patch-clamp* em neurônios corticais retirados de ratos, que a apigenina reduziu as correntes mediadas pelos receptores NMDA (*N*-metil-d-aspartato) da via excitatória glutamatérgica.

3.4.2. Estudo do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*

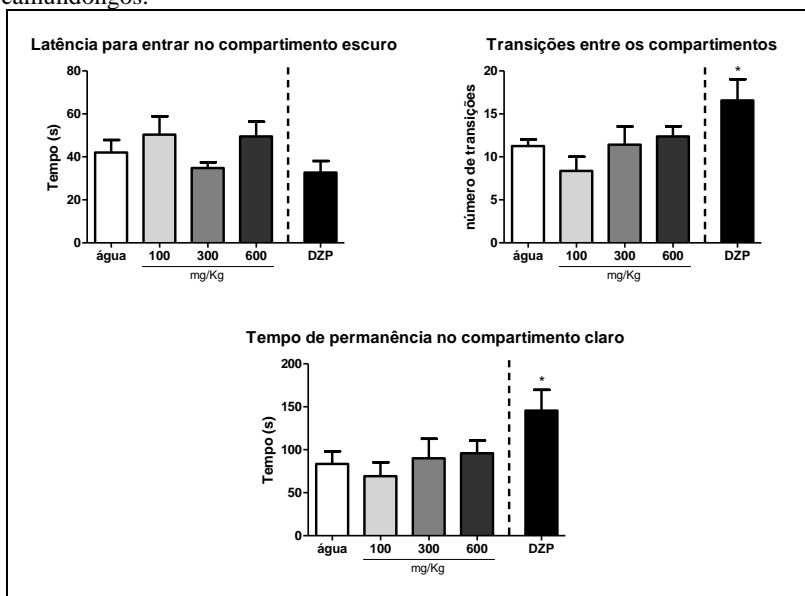
3.4.2.1. Avaliação da atividade tipo-ansiolítica

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho para o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*, o qual além de apresentar atividade sedativa também mostrou atividade tipo-ansiolítica, esta atividade também foi avaliada para o extrato aquoso das folhas dessa espécie. Os testes realizados para a investigação da atividade tipo-ansiolítica do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* foram os mesmos utilizados para o extrato aquoso do pericarpo da espécie, ou seja, o teste de transições claro-escuro, teste de esconder esferas e o teste do campo aberto.

3.4.2.1.1. *Teste de transições claro-escuro*

O extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg, não modificou nenhum dos parâmetros avaliados no teste de transições claro-escuro, quando comparado ao grupo controle (Fig. 3.27). Esse resultado indica que esse extrato não apresenta atividade tipo-ansiolítica nesse teste e nessas doses, diferentemente do observado para o extrato do pericarpo.

Figura 3.27: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de transições claro-escuro em camundongos.



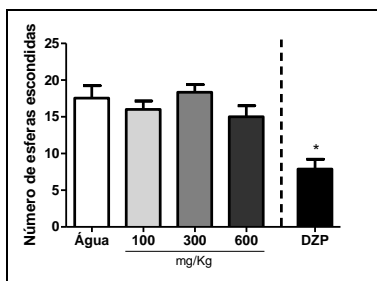
O diazepam (DZP) (2,5 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. $*p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

3.4.2.1.2. Teste de esconder esferas

Como já discutido anteriormente, o teste de esconder esferas indica substâncias com possível atividade ansiolítica para o tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo (LONDEI; VALENTINI; LEONE, 1998; BOER; KOOLHAAS, 2003; ALBELDA; JOEL, 2012).

Diferentemente do observado para o extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*, o extrato aquoso das folhas da espécie não diminuiu o número de esferas escondidas pelos animais tratados com o extrato em nenhuma das doses testadas (Fig. 3.28).

Figura 3.28: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) no teste de esconder esferas em camundongos.

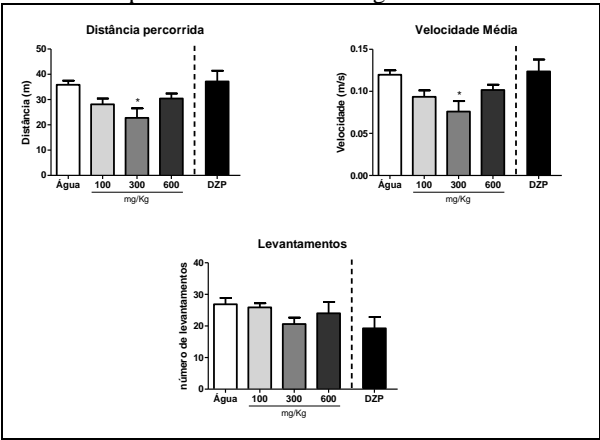


O diazepam (DZP) (2,5 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8-9$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

3.4.2.1.3. Teste do campo aberto

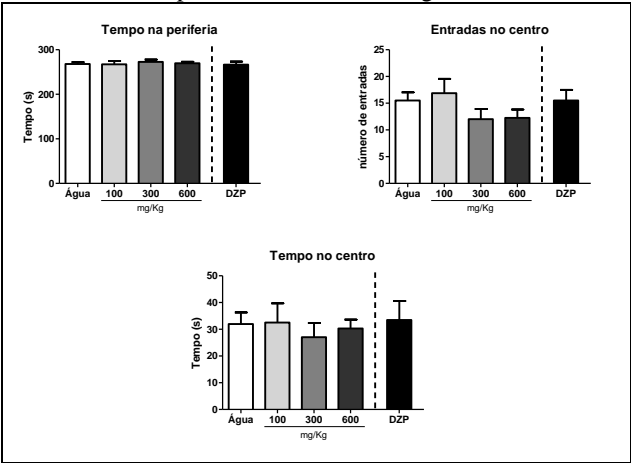
No teste do campo aberto foram avaliados parâmetros relacionados à atividade locomotora (Fig. 3.29) e parâmetros relacionados à atividade tipo-ansiolítica (Fig. 3.30). No entanto, com relação aos parâmetros relacionados à atividade tipo-ansiolítica, esse teste não foi capaz de detectar qualquer atividade tipo-ansiolítica, já que o controle positivo (diazepam 2,0 mg/kg) não aumentou o tempo de permanência e o número de entradas dos animais no centro do aparato, o que seria esperado de fármacos ansiolíticos, como o diazepam. Por outro lado, foi possível verificar que o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, na dose de 300 mg/kg, reduziu a distância percorrida pelos animais [$F(3,28) = 4,616$; $p = 0,0096$], bem como a velocidade média da movimentação dos mesmos [$F(3,28) = 4,632$; $p = 0,0094$], quando comparados ao grupo controle. Esse dado fortalece o efeito sedativo desse extrato, assim como o observado por Romanini e colaboradores (2006) nesse mesmo teste para o extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata* (300 mg/kg), utilizando a mesma via de administração e linhagem de camundongos. Ainda, considerando esse resultado em conjunto ao descrito na avaliação da atividade sedativa pelo teste do sono induzido por éter etílico (capítulo 2), pode-se sugerir que esse extrato apresenta atividade sedativa *per se*.

Figura 3.29: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade motora no teste do campo aberto em camundongos.



O diazepam (DZP) (2,0 mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. n = 8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. $*p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste *t* de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Figura 3.30: Efeitos do tratamento oral com o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (100, 300 e 600 mg/kg) nos parâmetros relacionados à atividade ansiolítica no teste do campo aberto em camundongos.



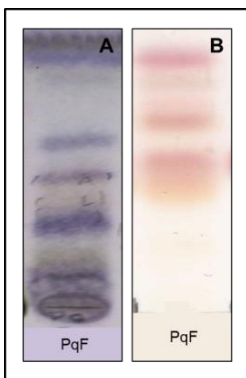
O diazepam (DZP) (2,0 mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. n = 8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m.

A avaliação da atividade tipo-ansiolítica para o extrato aquoso e hidroetanólico das folhas de *P. quadrangularis* foi previamente descrita por Castro e colaboradores (2007). No referido estudo o extrato aquoso, administrado nas doses de 100, 500 e 1000 mg/kg em ratos, não modificou os parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado, indicando ausência de atividade tipo-ansiolítica. Por outro lado, o extrato hidroetanólico das folhas apresentou atividade tipo-ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado (500 mg/kg), no teste do campo aberto (100, 250 e 500 mg/kg) e no teste da placa perfurada (250 mg/kg) (CASTRO et al., 2007).

3.4.2.2. Avaliação da composição química e obtenção das frações enriquecidas nos principais metabólitos

Por se tratar de um extrato aquoso, e considerando a provável presença de aminoácidos (previamente descritos em *P. incarnata* por MEIER, 1995) e saponinas (previamente descritas nas folhas da espécie – ver revisão da literatura), foi realizada a avaliação da presença desses compostos nesse extrato. A cromatografia em camada delgada (CCD) apresentada na figura 3.31 mostra a revelação de substâncias com coloração e tempo de retenção compatíveis com a presença de saponinas (Fig. 3.31A) e aminoácidos (Fig. 3.31B).

Figura 3.31: Cromatografias em camada delgada do extrato aquoso das folhas de *Passiflora quadrangularis* reveladas com anisaldeído sulfúrico (A) e com ninhidrina (B).

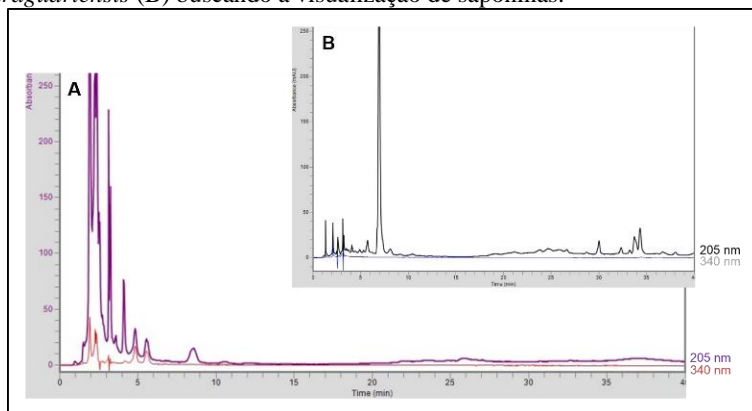


PqF– extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

Além da CCD, a análise de saponinas do extrato aquoso das folhas foi realizada por CLAE-DAD (Fig. 3.32A). Nessa análise pode-se

verificar a presença de substâncias com absorção em 205 nm e que não apresentam absorção em 340 nm, mesmo comportamento observado no cromatograma de uma mistura de saponinas de *Ilex paraguariensis* (Fig. 3.32B), excluindo assim a possibilidade de que esses compostos correspondam aos flavonoides presentes no extrato. O comportamento cromatográfico desses compostos indica ainda que os mesmos são de compostos polares.

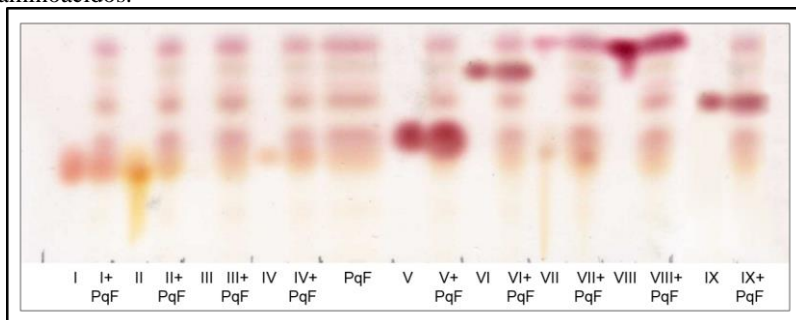
Figura 3.32: Cromatogramas do extrato aquoso obtido das folhas (A) de *Passiflora quadrangularis* e de uma mistura de saponinas de *Ilex paraguariensis* (B) buscando a visualização de saponinas.



Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

Ainda, levando em consideração que a presença de GABA já foi previamente descrita por outros autores para espécies de *Passiflora* e que esse composto é um importante neurotransmissor, realizou-se a avaliação dos aminoácidos presentes no extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC). Na CCDC, apresentada na figura 3.33, pode-se observar que dentre todos os padrões de aminoácidos cromatografados com o extrato, prolina (IV), alanina (V), ácido glutâmico (VII) e GABA (IX) estão presentes.

Figura 3.33: Cromatografias em camada delgada comparativas do extrato aquoso obtido das folhas de *Passiflora quadrangularis* com padrões de aminoácidos.



PqF– extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, I- glicocol, II-serina, III-asparagina, IV- prolina, V- alanina, VI- metionina, VII- ácido glutâmico, VIII-leucina e IX- GABA. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

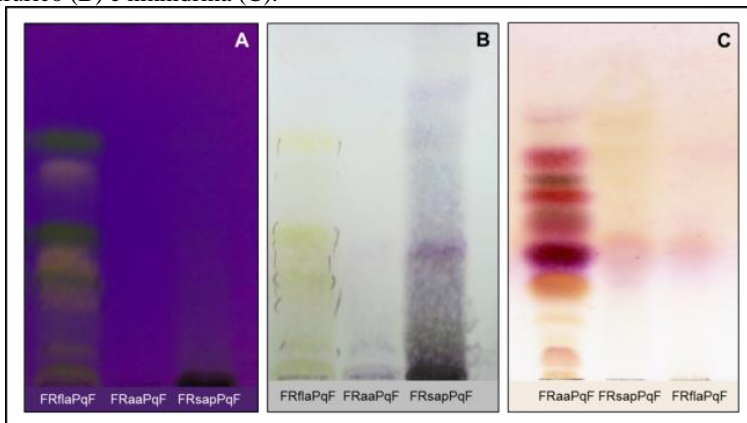
Sumarizando os resultados obtidos nas análises dos compostos químicos do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* foi observada a presença de flavonoides, saponinas e aminoácidos como compostos predominantes. Considerando-se os flavonoides, já foi demonstrado no capítulo 2 desta tese que vitexina-2''-*O*-xilósídeo é o composto majoritário. Ainda, foi observada a presença de saponinas e aminoácidos, tendo sido identificados prolina, alanina e ácido glutâmico (Para uma descrição mais pormenorizada dos compostos químicos ver COSTA, 2013).

3.4.2.2.1. Obtenção das frações enriquecidas em aminoácidos, saponinas e flavonoides

Levando-se em consideração os principais metabólitos presentes no extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, foi realizado um fracionamento do mesmo, cujos procedimentos metodológicos estão descritos no item 3.3.3. Obtiveram-se as seguintes frações: fração enriquecida em aminoácidos, fração enriquecida em saponinas e fração enriquecida em flavonoides.

Como é possível verificar através das CCDs na figura 3.34, o fracionamento realizado resultou em efetiva separação dessas classes de compostos. Ou seja, foi possível separar frações com grande predominância de aminoácidos, saponinas ou flavonoides.

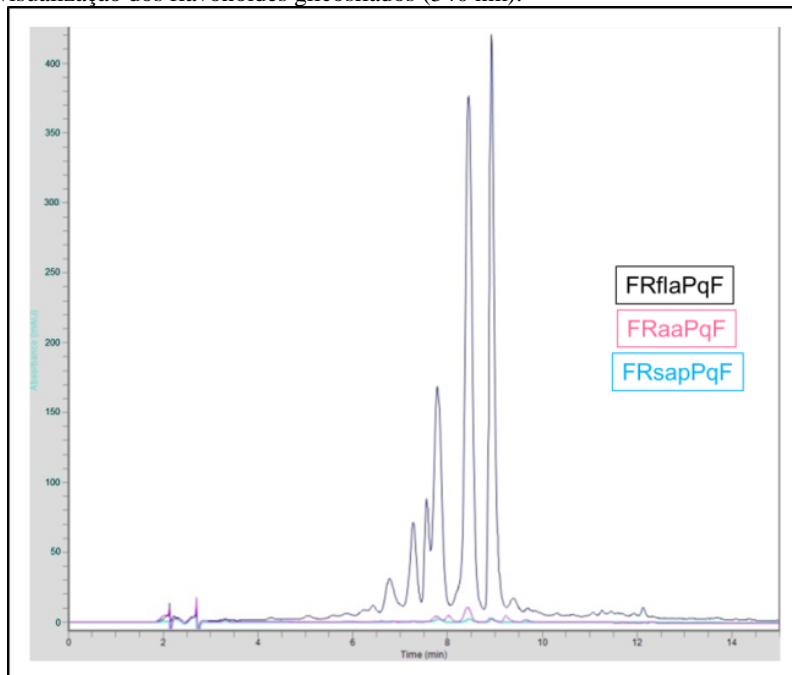
Figura 3.34: Cromatografias em camada delgada das frações enriquecidas nos compostos majoritários do extrato aquoso das folhas de *Passiflora quadrangularis* reveladas com reagente natural/UV 365nm (A), anisaldeído sulfúrico (B) e ninhidrina (C).



FRaaPqF– fração enriquecida em aminoácidos do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, FRsapPqF– fração enriquecida em saponinas do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* e FRflaPqF– fração enriquecida em flavonoides do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

Na figura 3.35 são apresentados os cromatogramas obtidos a partir de soluções a 1mg/ml das frações enriquecidas, utilizando-se o método para observação dos flavonoides glicosilados por CLAE-DAD. É possível observar a grande predominância de flavonoides no cromatograma da fração enriquecida em flavonoides quando comparado aos cromatogramas das frações enriquecidas em aminoácidos e saponinas.

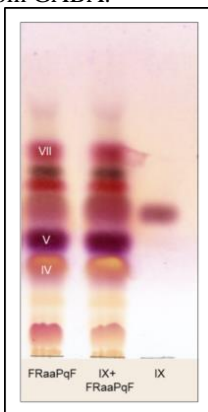
Figura 3.35: Comparação dos cromatogramas das frações enriquecidas em flavonoides (FRflaPqF), aminoácidos (FRaaPqF) e saponinas (FRsapPqF) obtidas do extrato aquoso das folhas de *Passiflora quadrangularis*, para a visualização dos flavonoides glicosilados (340 nm).



Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

Por fim, a análise por CCDC (Fig. 3.36) da fração enriquecida em aminoácidos com padrões comerciais de aminoácidos indicou a existência de prolina (IV), alanina (V) e ácido glutâmico (VII), anteriormente observados no extrato, além da presença de GABA nessa fração.

Figura 3.36: Cromatografias em Camada Delgada Comparativa da fração rica em aminoácidos proveniente do extrato aquoso das folhas de *Passiflora quadrangularis* (FRaaPqF) com GABA.



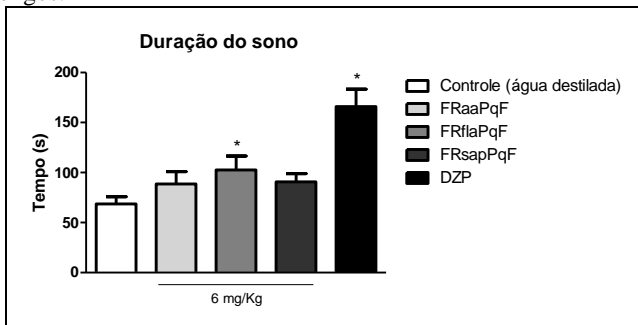
IV- prolina, V- alanina, VII- ácido glutâmico e IX- GABA. Para condições cromatográficas vide Material e Métodos.

3.4.2.3. Avaliação da atividade sedativa das frações enriquecidas em aminoácido, saponinas e flavonoides

Levando-se em consideração que o fracionamento do extrato permitiu a concentração das substâncias ativas em determinadas frações, a dose a ser administrada aos animais dessas frações precisou ser reduzida. Dessa forma, as frações enriquecidas nos compostos majoritários do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, ou seja em aminoácidos, saponinas e flavonoides, foram testadas na dose de 6 mg/kg (10 vezes menor que a dose efetiva do extrato de origem nesse teste – capítulo 2).

Após a realização do teste ficou evidente que a atividade sedativa do extrato das folhas da espécie está diretamente ligada aos flavonoides presentes no mesmo, já que apenas a fração enriquecida em flavonoides aumentou o tempo de duração do sono dos animais [$t=0,0412$] quando comparado ao grupo controle (Fig. 3.37).

Figura 3.37: Efeitos do tratamento oral com a fração enriquecida em aminoácidos (FRaaPqF), da fração enriquecida em flavonoides (FRflaPqF) e da fração enriquecida em saponinas (FRsapPqF) (6,0 mg/kg) do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, v.o.) foi utilizado como fármaco padrão. n = 11-12 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (teste *t* de Student não pareado).

3.4.2.4. Obtenção do flavonoide majoritário vitexina-2''-O-xilosídeo

Tendo em vista que a fração enriquecida em flavonoides foi a única que apresentou atividade sedativa no teste utilizado, mostrando que essa atividade está relacionada aos flavonoides presentes no extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, o flavonoide majoritário desse extrato, vitexina-2''-O-xilosídeo foi isolado para avaliação posterior de sua atividade sedativa.

O isolamento desse flavonoide em quantidade suficiente para experimentos farmacológicos foi realizado pelo doutor Geison Modesti Costa durante seu estágio doutoral na Universidad Nacional de Colombia em trabalho químico paralelo a este, com os mesmos extratos.

Na literatura existem relatos da ocorrência dessa substância em espécies vegetais, principalmente da família Passifloraceae: *Passiflora serratia* (ULUBELEN; MABRY, 1980), *P. cyanea*, *P. oerstedii* (ULUBELEN; AYYILDIZ, 1981), *P. serratodigitata* (ULUBELEN; KERR; MABRY, 1982), *P. pittieri*, *P. alata* e *Adenia mannii* (ULUBELEN et al., 1982) e também em algumas plantas de diferentes famílias: *Setaria italica* e *S. viridis* (Poaceae) (GLUCHOFF-FIASSON; JAY; VIRICEL, 1989; KWON et al., 2002), *Clusia columnaris*

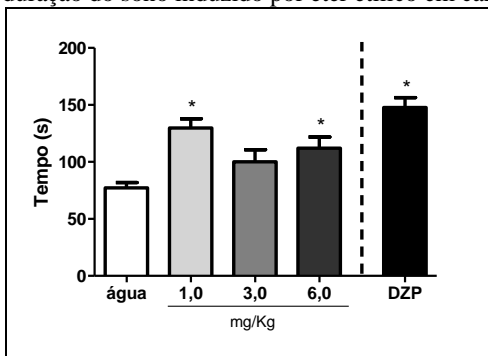
(Guttiferae) (COMPAGNONE et al., 2008) e *Beta vulgaris* f. *cicla* (Amaranthaceae) (GENNARI et al., 2011).

3.4.2.5. Avaliação da atividade sedativa de vitexina-2''-O-xilosídeo no teste do sono induzido por éter e pentobarbital

Levando em consideração a quantificação de vitexina-2''-O-xilosídeo no extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* (29,16 mg/g) (COSTA et al., 2013) foi possível calcular a dose da mesma a ser utilizada no teste do sono induzido por éter etílico. Lembrando que a dose efetiva do extrato foi de 60 mg/kg nesse teste, o que corresponde à administração de 1,7 mg/kg de vitexina-2''-O-xilosídeo, as doses escolhidas para serem testadas, utilizando escala logarítmica, foram: 1,0; 3,0 e 6,0 mg/kg.

Na figura 3.38 pode-se perceber que o flavonoide vitexina-2''-O-xilosídeo aumentou a duração do sono induzido pelo éter etílico nas doses de 1,0 e 6,0 mg/kg [$F(3,27) = 6,216$; $p = 0,0024$] evidenciando o efeito sedativo dessa substância nesse ensaio. Com esse resultado é possível inferir que essa substância seja a principal responsável pela atividade sedativa do extrato em questão.

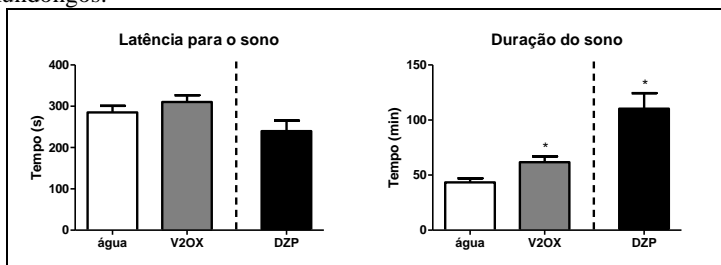
Figura 3.38: Efeitos do tratamento oral com a vitexina-2''-O-xilosídeo (1,0; 3,0 e 6,0mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1,0 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Como realizado com apigenina, a atividade sedativa de vitexina-2''-*O*-xilósídeo também foi avaliada pelo teste do sono barbitúrico e, assim como no teste do sono induzido por éter etílico, essa substância prolongou o sono dos animais quando administrada na dose de 1,0 mg/kg (Fig. 3.39).

Figura 3.39: Efeitos do tratamento oral (gavagem) da vitexina-2''-*O*-xilósídeo (V2OX) (1,0 mg/kg) no teste de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.



O diazepam (DZP) (1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett; o teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

Este é o primeiro relato acerca da atividade neurofarmacológica de vitexina-2''-*O*-xilósídeo. Com relação às outras atividades farmacológicas, um trabalho descreve a avaliação da atividade antioxidante dessa substância através do teste do DPPH, porém ela não foi considerada ativa (KWON et al., 2002). Por outro lado, Ninfali e colaboradores (2007) descrevem que a vitexina-2''-*O*-xilósídeo apresentou baixa atividade antioxidante (teste ORAC) e que, quando associada a outros flavonoides (exemplos: vitexina-2''-*O*-rhamnosídeo, isoramnetina-3-gentiobiosídeo e rutina) em uma fração fenólica obtida de *Beta vulgaris* f. *cicla* inibiu a proliferação de células de câncer mamário MCF-7. Nesse mesmo sentido, a vitexina-2''-*O*-xilósídeo inibiu a proliferação de células cancerígenas intestinais, tais como RKO ($IC_{50} = 89 \pm 9$ mg/ml) (GENNARI et al., 2011), LoVo ($IC_{50} = 158 \pm 13$ mg/ml) e CaCo-2 ($IC_{50} = 120 \pm 9$ mg/ml) por apoptose (PAPI et al., 2013). Além disso, Papi e colaboradores (2013) demonstraram que a inibição da proliferação das linhagens celulares LoVo e Caco-2 é aumentada quando a vitexina-2''-*O*-xilósídeo é associada a epigallocatequina-3-galato e glicorafasatina.

Além das atividades farmacológicas, a biodisponibilidade de vitexina-2''-*O*-xilósídeo foi determinada por dois diferentes métodos pelo mesmo grupo de pesquisa. No primeiro método, os autores demonstraram através de um imunoensaio que a concentração plasmática de flavonoides com estrutura do tipo vitexina após administração oral de 170 mg/kg de vitexina-2''-*O*-xilósídeo a camundongos foi de $3,42 \pm 0.72$ µg/ml (NINFALI et al., 2013). No segundo método, Angelino e colaboradores (2013) relataram que, após a introdução de 8,15 mmol de vitexina-2''-*O*-xilósídeo no ceco de ratos operados, o perfil plasmático dos animais, observado por CLAE, mostrou a presença de dois picos correspondendo à vitexina-2''-*O*-xilósídeo e a seu metabólito glicuronado.

3.4.2.6. Avaliação do envolvimento da via GABAérgica na atividade sedativa de vitexina-2''-*O*-xilósídeo

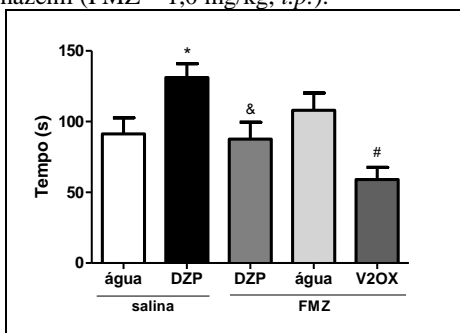
Levando em consideração a atividade sedativa observada para a vitexina-2''-*O*-xilósídeo, e que uma das principais vias neurológicas envolvidas na depressão do SNC e, consequentemente, na atividade sedativa de um composto é a via GABAérgica, o envolvimento dessa via na atividade sedativa de vitexina-2''-*O*-xilósídeo foi avaliada por um teste *in vivo* e outro *in vitro*.

3.4.2.6.1. Teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil

Como já comentado anteriormente, o flumazenil é um antagonista específico benzodiazepínico. Desta forma, no pré-tratamento com flumazenil, esse composto se liga ao sítio benzodiazepínico, impedindo que o composto teste se ligue a esse sítio (caso esse seja o mecanismo de ação), aumentando a duração do sono nos animais (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2011).

Na figura 3.40 é possível observar que a administração prévia de flumazenil aos camundongos impediu que a vitexina-2''-*O*-xilósídeo aumentasse a duração do sono dos animais. Esse resultado indica que vitexina-2''-*O*-xilósídeo apresenta atividade sedativa pela ativação dos receptores GABA_A após ligação ao sítio benzodiazepínico.

Figura 3.40: Efeitos do tratamento oral com a vitexina-2''-*O*-xilósídeo (V2OX – 1,0 mg/kg) na duração do sono induzido por éter etílico em camundongos pré-tratados com flumazenil (FMZ – 1,0 mg/kg, *i.p.*).



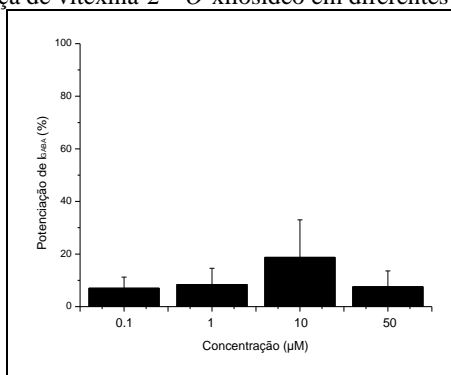
O diazepam (DZP - 1 mg/kg, *v.o.*) foi utilizado como fármaco padrão. $n = 7-8$ animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. *, & e # indicam que $p \leq 0.05$ comparado com os grupos: salina/água; salina/DZP e FMZ/água, respectivamente (teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

3.4.2.6.2. *Teste eletrofisiológico do tipo voltage clamp*

Buscando aprofundar ainda mais a pesquisa acerca do mecanismo de ação através da ativação dos receptores GABA_A/benzodiazepínicos de vitexina-2''-*O*-xilósídeo, o teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* foi realizado com esse composto em oócitos de *X. laevis* expressando receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. Esse subtipo foi escolhido, como indicado previamente, por ter sido demonstrado que o mesmo é o principal subtipo envolvido na atividade sedativa de compostos encontrados atualmente na clínica (MCKERNAN et al, 2000).

No teste eletrofisiológico, a vitexina-2''-*O*-xilósídeo não evocou uma I_{GABA} significativa (Fig. 3.41), o que evidencia que não é através dessa via somente que esse composto produz sua atividade sedativa. Esse resultado se contrapõe ao resultado observado no teste *in vivo* de atividade sedativa após tratamento com o flumazenil.

Figura 3.41: Modulação da corrente de cloreto induzida pelo controle GABA (I_{GABA}) na presença de vitexina-2''-*O*-xilósídeo em diferentes concentrações.



Receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. Concentrações de GABA capazes de induzir 3–7% da resposta máxima (EC_{3-7}). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 3 oócitos de, pelo menos, duas fêmeas de *X. laevis* diferentes.

Os processos do metabolismo de flavonoides são pouco investigados, principalmente para flavonoides C-glicosilados. Sabe-se que a extensão de absorção de muitas substâncias administradas por via oral é influenciada por diferentes fatores, tais como: estabilidade química do composto desde a administração até o local de absorção; taxa de degradação por pH e microorganismos intestinais; mecanismos do processo de absorção; taxa de ligação a proteínas plasmáticas e extensão do efeito de primeira passagem (MESKIN et al., 2004). Além disso, com relação aos metabólitos da vitexina-2''-*O*-xilósídeo pode-se descrever que, após a introdução desse composto no ceco de ratos operados (8,15 μ mol), Angelino e colaboradores (2013) observaram principalmente a presença desse composto glucuronado (aproximadamente 260 μ M) no plasma portal dos animais através de CLAE acoplado à DAD e espectrometria de massas.

3.5. SUMÁRIO DE RESULTADOS

Os seguintes resultados foram obtidos no estudo do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis*:

- Esse extrato apresentou atividade tipo-ansiolítica no teste de transições claro-escuro e teste de esconder esferas nas doses de 100 e 600 mg/kg, respectivamente, sem prejudicar a

atividade locomotora. Esses resultados também sugerem que o extrato não possui atividade sedativa *per se*;

- Nos testes que avaliaram atividade tipo-antidepressiva e anticonvulsivante o extrato não modificou o comportamento dos animais nas doses e testes utilizados;
- O flavonoide majoritário do extrato, apigenina, não apresentou atividade tipo-ansiolítica nas doses de 0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/kg no teste de transições claro-escuro em camundongos e, por isso, não pode ser atribuída a essa substância essa atividade do extrato;
- A apigenina apresentou atividade sedativa na dose de 0,6 mg/kg nos testes de sono induzido por éter etílico e pentobarbital. Dessa forma, a apigenina foi considerada como um dos compostos responsáveis pela atividade sedativa do extrato;
- O teste do sono induzido por éter etílico após pré-tratamento com flumazenil indicou que apigenina possivelmente apresenta atividade sedativa a partir da abertura dos canais de cloreto dos receptores GABA_A após ligação ao sítio benzodiazepínico desses receptores;
- Nos testes eletrofisiológicos do tipo *voltage clamp*, a apigenina e a luteolina (metabólito formado após a administração oral de apigenina) não aumentaram a corrente de cloreto GABAérgica intracelular;
- Os resultados *in vivo* e *in vitro* indicam que a ação sedativa da apigenina não parece ocorrer diretamente sobre os receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, porém demonstram que a via GABAérgica está envolvida.

Com relação aos resultados obtidos no estudo do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* é possível apontar as seguintes conclusões:

- Esse extrato não apresentou atividade tipo-ansiolítica nos testes de transição claro-escuro, esconder esferas e campo aberto, porém reduziu a mobilidade dos animais no teste campo aberto, o que indica atividade sedativa *per se*;
- Na análise química, foi observada a presença de flavonoides, saponinas com caráter polar e aminoácidos a partir de análises por CCD e CLAE. Dentre os aminoácidos foram identificados prolina, alanina, ácido glutâmico e GABA;

- Na avaliação da atividade sedativa das frações enriquecidas em aminoácidos, saponinas e flavonoides no teste do sono induzido por éter etílico, apenas a fração enriquecida em flavonoides apresentou atividade sedativa, indicando a correlação entre a atividade sedativa do extrato e os flavonoides presentes;
- O flavonoide majoritário desse extrato, a vitexina-2''-*O*-xilosídeo, apresentou atividade sedativa nos testes do sono induzido por éter etílico (1,0 e 6,0 mg/kg) e pentobarbital (1,0 mg/kg);
- O pré-tratamento com flumazenil no teste do sono induzido por éter etílico preveniu a atividade sedativa de vitexina-2''-*O*-xilosídeo, mostrando a ativação da via GABAérgica após a ligação desse flavonoide aos sítios benzodiazepínicos dos receptores GABA_A;
- A vitexina-2''-*O*-xilosídeo não aumentou a corrente de cloreto associada a ativação dos receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ no teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp*;
- A sedação observada após administração oral de vitexina-2''-*O*-xilosídeo decorre, ao menos em parte, da ativação da via GABAérgica, porém os mecanismos moleculares precisam ser melhor explicados.

CONSIDERAÇÕES	FINAIS	E
PERSPECTIVAS		

Espécies de *Passiflora* são utilizadas no tratamento de ansiedade e insônia há muito tempo pela população (SCHINDLER, 1884; CUNHA, 1941; PIO CORRÊA, 1978; BLUMENTHAL, 1998). No Brasil, além do preparo de chás, é possível observar a utilização de medicamentos fitoterápicos obtidos com extratos dessas espécies. Já em 1984 estavam registrados no País 147 fitoterápicos contendo extratos de *Passiflora*, porém cabe mencionar que nem todos esses medicamentos eram necessariamente comercializados, já que algumas empresas registravam a marca, porém não disponibilizavam o produto ou o retiravam logo do mercado (ORTEGA et al., 1989). Ainda, demonstrando a importância de fitoterápicos contendo *Passiflora* no mercado nacional, Freitas (2007) apresenta uma lista com os 20 fitoterápicos com maior faturamento em 2006. Cinco desses produtos contém extratos de passiflora e arrecadaram juntos aproximadamente 62 milhões de reais naquele ano (MARQUES; SOUZA, 2012). Estudos acerca das propriedades neurofarmacológicas de espécies de *Passiflora* estão centrados basicamente em *P. incarnata*, porém outras espécies estão sendo utilizadas para a produção de fitoterápicos ansiolíticos, como o caso de *P. tripartita* f. *mollissima* na Colômbia (conforme abordado no Capítulo 2). Esse aumento da utilização de fitoterápicos para o tratamento da ansiedade e insônia provavelmente deve-se à busca de medicamentos sem muitos efeitos colaterais. Atualmente, os medicamentos mais utilizados para o tratamento desses transtornos são os benzodiazepínicos que, apesar de revolucionarem a terapia medicamentosa devido a diminuição dos efeitos adversos em relação aos barbitúricos, têm potencial de causar dependência e síndrome de retirada no caso de uso prolongado (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2011).

Nesse contexto, estudos acerca da composição química e das atividades farmacológicas de espécies de *Passiflora*, bem como a busca por substâncias ativas provenientes das espécies utilizadas, é importante. O presente trabalho foi centrado na investigação de possíveis atividades no Sistema Nervoso Central (SNC) de 14 (quatorze) extratos provenientes de seis espécies de *Passiflora* de ocorrência predominante na Colômbia e no Brasil, que ainda são pouco estudadas.

Levando-se em consideração o uso popular e o elevado número de extratos estudados, escolheu-se o teste do sono induzido por éter etílico para a realização da triagem farmacológica. O teste do sono induzido por éter etílico é uma técnica bastante rápida que reduz a possibilidade de resultados falso-positivos, em contraposição ao teste

clássico de prolongamento do sono barbitúrico, devido ao éter não ser metabolizado hepaticamente (como ocorre com os barbitúricos - SHAH et al., 1996; WILKINSON, 2005; CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005) e não haver necessidade de registro da locomoção do animal (como no caso da telemetria, campo aberto, labirinto em cruz elevado, entre outros). Na triagem farmacológica, das seis espécies estudadas no presente trabalho, a *P. quadrangularis* apresentou os resultados mais proeminentes e por isso foi escolhida para investigação mais detalhada.

Das outras espécies cabe ressaltar que *P. manicata* e *P. ligularis* não são utilizadas popularmente como calmantes / sedativas. Também não foram encontrados na literatura muitos dados farmacológicos para essas espécies. Dessa forma, estudos mais aprofundados estão sendo realizados em parceria com outros grupos de pesquisa. Até o momento verificou-se que o extrato da polpa de *P. ligularis* possui atividade sedativa através do teste do sono induzido por éter etílico em doses mais baixas do que as avaliadas nessa tese (30 m/kg) e foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos camundongos na dose de 600 mg/kg no teste de suspensão pela cauda, indicando potencial atividade tipo-antidepressiva. Com relação a *P. manicata* o extrato estudado neste trabalho mostrou significativa atividade antioxidante e inibiu a glicação proteica em testes *in vivo* e *in vitro* (MORRONE et al., 2013).

Em trabalho de colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela pesquisadora Veronika Butterweck (Universidade da Flórida – EUA), os extratos das folhas e do pericarpo de *P. alata*, avaliados no presente trabalho com o teste do sono induzido por éter etílico, foram também testados através da telemetria. Com essa técnica verificou-se a atividade sedativa de ambos extratos nas doses de 600 e 1200 mg/kg em camundongos (KLEIN et al., 2014 – Anexo B). A biotelemetria é uma técnica onde transmissores (inseridos no peritônio dos animais) enviam sinais para um receptor acoplado a um computador no qual um *software* traduz esses sinais em parâmetros, tais como temperatura e locomoção (GÜLER; ÜBEYLI, 2002; KLEIN et al., 2014). Esse é considerado um método com algumas vantagens, uma vez que reduz a manipulação dos animais no momento do experimento (reduzindo o estresse) e permite a gravação de dados em períodos prolongados (CHOW et al., 2011). Como desvantagens, tem sido apontado que anteriormente aos testes os eletrodos são cirurgicamente inseridos nos animais (gerando um estresse prévio e podendo causar complicações pós-operatórias), além de possibilitar que substâncias que comprometam a locomoção dos animais sejam interpretadas como sedativas. Esses resultados, acompanhados de outros estudos prévios (BRAGA et al., 2013; OGA et al., 1984;

PROVENSI et al., 2008; ROMANINI et al., 2006), indicam que extratos provenientes de *P. alata* poderiam apresentar atividade sedativa em humanos e por isso tornarem-se medicamentos fitoterápicos. Porém, estudos recentes com um extrato aquoso seco por *spray-drier* das folhas dessa espécie mostraram toxicidade em ratos e camundongos. Boeira e colaboradores (2010) descrevem a ausência de efeitos tóxicos desse extrato após tratamento agudo por via oral em camundongos (doses até 4800 mg/kg – parâmetros avaliados: piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, locomoção, hipotermia, tônus muscular, tremores, paralisia das patas dianteiras, salivação, secreção brônquica, convulsões entre outras manifestações) ou subagudo em ratos (300 mg/kg - 14 dias – avaliados: parâmetros bioquímicos no sangue e urina e histopatológicos no coração, fígado, rins e pulmões). Por outro lado, no teste cometa, observaram indícios de genotoxicidade na administração aguda em camundongos (150 – 600 mg/kg, v.o.) com aumento significativo no índice e frequência de dano ao DNA em células de cérebro, fígado, sangue periférico e medula. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa confirmou os resultados acima, demonstrando que a administração repetida do extrato por via oral durante 15 dias não alterou os parâmetros comportamentais em camundongos. No entanto, os animais tratados na dose de 250 mg/kg apresentaram comprometimento de ganho de peso e, nas doses de 25 e 250 mg/kg, ocorreu redução do peso relativo do fígado, ligeira degeneração hepática hidrópica e diminuição do nível sérico da alanina aminotransferase (ALT) (BRAGA et al., 2013).

As propriedades tóxicas de extratos contendo alcaloides é descrita desde os primórdios da civilização. Sabe-se por exemplo que Sócrates foi executado na Grécia antiga pela ingestão de uma bebida à base de cicuta, contendo o alcaloide coniina (HENRIQUES et al., 2007). A presença de alcaloides do tipo harmano foi previamente descrita em espécies de *Passiflora* (LUTOMSKI; MALEK, 1975; LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975), inclusive em *P. alata* (OGA et al., 1984; ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2003). No entanto a presença desses alcaloides em concentrações iguais ou superiores a 0,1 ppm (µg/ml) não foi confirmada em extratos de *Passiflora* avaliados em outros estudos (GRICE; FERREIRA; GRIFFITHS, 2001; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; SANTOS et al., 2006). Assim, a investigação desses metabólitos foi também avaliada no extrato das folhas de *P. alata* utilizado neste trabalho por CCD, CLAE-DAD, cromatografia líquida

de ultra eficiência e eletroforese capilar, e não foram detectados alcaloides do tipo harmano em teores superiores a 0,0187 ppm (COSTA, 2013), o que torna improvável que causem toxicidade.

Com relação a *P. tripartita* f. *mollissima*, no presente trabalho não foi observada atividade sedativa para os três extratos aquosos, nas doses avaliadas no teste do sono induzido por éter etílico. Na Colômbia existem pelo menos cinco medicamentos fitoterápicos aprovados no órgão responsável pela vigilância de medicamentos naquele país (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA) contendo as folhas dessa espécie ou seus extratos, para o tratamento da ansiedade e da insônia. Cabe ressaltar que, neste trabalho, avaliou-se a atividade sedativa de extratos aquosos, já que normalmente esse é o tipo de extrato mais utilizado pela população e os fitoterápicos existentes no mercado colombiano são compostos por extratos hidroetanólicos. Assim, os resultados aqui obtidos não podem ser diretamente extrapolados e, por isso, indica-se estudos adicionais com outros extratos dessa espécie.

Da espécie escolhida para prosseguir com os estudos nesta tese, a *P. quadrangularis*, utilizou-se os extratos aquosos do pericarpo e das folhas. Verificou-se as atividades sedativa e tipo-ansiolítica do extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* e foi possível identificar a apigenina como um dos compostos responsáveis pela atividade sedativa. Apesar do baixo teor de apigenina no extrato (aproximadamente 2,5 mg/g), destaca-se que os frutos de *P. quadrangularis* apresentam 20-30 cm de comprimento por 12-15 cm de largura, pesando aproximadamente 2,5 kg (BERNAL; DÍAZ, 2005), sendo o pericarpo um resíduo que poderia ser utilizado para a obtenção desse flavonoide, talvez com um custo reduzido.

Para o extrato aquoso das folhas observou-se, pela primeira vez, sua atividade sedativa. Apenas um trabalho prévio descreve as propriedades dessa espécie no SNC, especificamente a atividade tipo-ansiolítica para o extrato hidroetanólico no teste do labirinto em cruz elevado (500 mg/kg), no teste do campo aberto (100, 250 e 500 mg/kg) e no teste da placa perfurada (250 mg/kg) (CASTRO et al., 2007). Na realização do fracionamento bioguiado pela atividade sedativa, ficou evidente que os flavonoides presentes no extrato estão correlacionados com a mesma. Considera-se esse resultado relevante já que alguns pesquisadores supõem que os efeitos sedativos e ansiolíticos de espécies de *Passiflora* devem-se à quantidade de GABA presente em seus extratos (ELSAS et al., 2010). Nesta tese é mostrado que quando frações enriquecidas em aminoácidos, flavonoides e saponinas foram avaliadas

na mesma dose no teste do sono induzido por éter, a fração de flavonoides foi a única que apresentou atividade sedativa mesmo tendo sido observado GABA na fração aminoácidos. O flavonoide majoritário do extrato, vitexina-2-*O*-xilósídeo (29,16 mg/g do extrato), apresentou atividade sedativa no teste do sono induzido por éter etílico em camundongos, sendo considerado como um dos compostos responsáveis por essa atividade desse extrato.

O envolvimento da via GABAérgica no mecanismo da ação sedativa dos flavonoides apigenina e vitexina-2''-*O*-xilósídeo foi avaliado através do teste do sono induzido por éter etílico após a administração de flumazenil, antagonista de receptores benzodiazepínicos (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2011), e pelo teste eletrofisiológico do tipo *voltage clamp* em receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Esse subtipo foi escolhido levando-se em consideração que aproximadamente 60% de todos os receptores GABA_A apresentam essa combinação (RUDOLPH; KNOFLACH, 2011). Os resultados do pré-tratamento com flumazenil indicam que os receptores GABA_A benzodiazepínicos estão envolvidos no mecanismo de ação desses compostos, porém os mecanismos moleculares necessitam ser melhor estudados, tendo em vista que os resultados do teste *voltage clamp* não confirmaram a ação sobre esses receptores.

É necessário também avaliar a absorção e metabolização desses flavonoides após a administração oral; verificando a possibilidade desses flavonoides, ou seus metabólitos, agirem em subtipos do receptor GABA_A diferente do avaliado nesta tese; e, ainda, analisar o envolvimento de outras vias neuronais.

Existem numerosos subtipos de receptores GABA_A visto que esses são heteropentâmeros formados por duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade γ sendo conhecidas 19 subunidades diferentes (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π e ρ_{1-3}). O sítio benzodiazepínico é formado na interface de uma das subunidades α (α_1 , α_2 , α_3 ou α_5) e uma subunidade γ (normalmente a subunidade γ_2 , que está presente em aproximadamente 90% dos receptores GABA_A). Até o momento subtipos de receptores contendo as subunidades α_4 e α_6 não parecem estar envolvidas no mecanismo de ação dos benzodiazepínicos (RUDOLPH; KNOFLACH, 2011). Com relação a outras vias neuronais envolvidas na sedação, podem ser citadas a via serotoninérgica e a glutamatérgica. Já na década de 70, um estudo em gatos demonstrou que a depleção de serotonina no SNC causava insônia nos animais. Assim,

substâncias que induzem o aumento de serotonina (como, por exemplo, o seu precursor *L*-triptofano) aceleram o início do sono e o mantêm por mais tempo (SANDERS-BUSH; MAYER, 2005). Ainda, a inibição do neurotransmissor excitatório glutamato poderia ser outra via envolvida no mecanismo sedativo de compostos (BLOOM, 2005).

Com relação à metabolização, estudos prévios *in vitro* e *ex vivo* demonstraram que a apigenina quando metabolizada por células hepáticas, é biotransformada em luteolina (metabólito majoritário), scutellarina e isoescutellarina nas reações de fase I da metabolização hepática. Nas reações de fase II ocorre a formação de diosmetina (derivado metilado da luteolina na posição 4') e compostos conjugados com ácido glicurônico (ésteres e éteres) e sulfatados (GRADOLATTO et al., 2004). Nesta tese, avaliou-se a capacidade da luteolina em induzir correntes de cloreto via receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$, porém, não foi possível verificar uma indução estatisticamente significativa mesmo a luteolina tendo potencializado I_{GABA} em aproximadamente 15% (1 μ m). Cabe aqui comentar dados não publicados obtidos no Departamento de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Viena onde a diosmetina (10 μ m) potencializou a I_{GABA} (aproximadamente 11%) em receptores GABA_A subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$. Esses resultados inferem uma possível relação entre os metabólitos formados após a biotransformação hepática da apigenina com sua atividade sedativa.

Existe ao menos um estudo acerca da metabolização de apigenina, porém, para a vitexina-2''-*O*-xilósídeo não foram encontrados trabalhos. Sabe-se muito pouco sobre a metabolização e biodisponibilidade de flavonoides C-glicosilados. Acerca desse assunto cita-se dois trabalhos de um mesmo grupo de pesquisa encontrados na literatura realizados com vitexina-2-*O*-ramnosídeo. No primeiro trabalho os autores verificaram que esse flavonoide apresentava perfil farmacocinético de primeira-ordem após sua administração (intravenosa) em ratos em doses crescentes (YING et al., 2007a). Posteriormente, os pesquisadores conseguiram quantificar a vitexina-2-*O*-ramnosídeo no plasma de ratos até 360 min após a administração oral (por UPLC-ESI-EM/EM), demonstrando que esse flavonoide é absorvido na forma heterosídica (YING et al., 2007b). Por esse motivo durante a realização deste trabalho iniciou-se a avaliação da biodisponibilidade de diferentes flavonoides no ensaio PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), sendo eles: crisina, luteolina, orientina, isoorientina, apigenina, vitexina, isovitexina, vitexina-2-*O*-xilósídeo, swertisina e spinosina. Os resultados (não apresentados) mostraram que os flavonoides testados conseguem

permeiar através da camada lipídica formada, porém com baixos coeficientes de permeabilidade efetiva ($\log P_e$). Desta forma, estudos em células CaCo-2, que possibilitam a avaliação da permeação de substâncias através de proteínas facilitadoras são ainda necessários. Na literatura é possível encontrar resultados relativos a permeação de agliconas de flavonoides em PAMPA (mimetizando a barreira hematoencefálica - FERNÁNDEZ-BACHILLER et al., 2012) e agliconas e *O*-heterosídeos em CaCo-2 (NODA; TANABE; SUZUKI, 2012; WANG et al., 2009; ZHANG; HUANG; YANG, 2010). Apenas um estudo que avaliou a permeabilidade dos flavonoides *C*-glicosídeos isovitexina e puerarina (dentre outras agliconas e *O*-glicosídeos) foi encontrado. Nesse trabalho os autores demonstraram que ambos flavonoides permearam através da membrana apesar dos baixos coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}) (TIAN et al., 2009).

Os resultados e conclusões obtidos nessa tese contribuem para um maior conhecimento das atividades neurofarmacológicas de espécies de *Passiflora*, especificamente quanto à atividade sedativa dos extratos aquosos. Foi possível identificar a apigenina e a vitexina-2''-*O*-xilósídeo como os principais flavonoides responsáveis pela atividade sedativa dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis*, respectivamente. Ainda, há uma contribuição para a disseminação dos conhecimentos químicos e farmacológicos de algumas espécies estudadas, já que os resultados obtidos estão publicados em artigos científicos e foram apresentados em congressos nacionais e internacionais (Anexos A) além da submissão de três artigos a revistas científicas da área que estão sob avaliação dos revisores.

No decorrer do trabalho, algumas hipóteses foram surgindo, porém não puderam ser abordadas na presente tese, tornando-se assim temas a serem respondidos por trabalhos futuros. Dentre essas pode-se destacar:

- Avaliar química e neurofarmacologicamente o extrato hidroetanólico de *P. tripartita* f. *mollissima*, já que esse extrato é utilizado para a produção de medicamentos fitoterápicos com a indicação hipnótico/sedativos comercializados na Colômbia e o extrato aquoso não demonstrou esse efeito nas doses e teste utilizados.
- Buscar a padronização dos extratos aquosos do pericarpo e das folhas de *P. quadrangularis* como possível matéria-

prima farmacêutica na produção de medicamentos fitoterápicos.

- Realizar estudos mais detalhados quanto ao mecanismo da ação sedativa dos flavonoides apigenina e vitexina-2''-O-xilosídeo, como:
 - Verificar os principais metabólitos formados após a administração por via oral desses flavonoides e suas possíveis ações no SNC;
 - Realizar experimentos com outros subtipos de receptores GABA_A, tanto para os flavonoides constatados como componentes majoritários dessas espécies de *Passiflora*, quanto para seus metabólitos;
 - Analisar o possível envolvimento de outras vias neuronais, tais como a serotoninérgica e a glutamatérgica, que poderiam resultar em depressão do SNC.

REFERÊNCIAS

ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.R.; KHAN, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.2, p.81-91, 2002.

ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.R.; KHAN, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – II. Application to Harman alkaloids of genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.2, p.100-106, 2003.

ALBELDA, N.; JOEL, D. Animal models of obsessive-compulsive disorder: Exploring pharmacology and neural substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.36, p.47-63, 2012.

ANDREATINI, R. Uso de fitoterápicos em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.22, n.3, p.104-105, 2000.

ANGELINO, D.; BERHOW, M.; NINFALIA, P.; JEFFERY, E.H. Caecal absorption of vitexin-2-*O*-xyloside and its aglycone apigenin, in the rat. **Food & Function**, v.4, p.1339–1345, 2013.

APA - American Psychiatric Association. **DSM-V - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ARBELAEZ, E.P. **Plantas útiles de Colombia**. 5.ed. Bogotá: Fondo Fen. Colombia. Dama Jardin Botanico José Celestino Mutis, 1996.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v.21, n.2, p.205-35, 1973.

ASTURIZAGA, A.S.; OLLGAARD, B.; BALSLEV, H. Frutos comestibles. **Botánica Económica de los Andes Centrales**, p.329-346, 2006.

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUIA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological Profile of Apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology**, v.59, p.1387-1394, 2000.

BABURIN, I.; BEYL, S.; HERING, S. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.453, p.117-123, 2006.

BARBOSA, P.R.; VALVASSORI, S.S.; BORDIGNON, C.L. JR.; KAPPEL, V.D.; MARTINS, M.R.; GAVIOLI, E.C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F.H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.2, p.282-288, 2008.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; ARAÚJO, J.X.Jr. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. Cap.8, p.147-210.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R. da S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.566-576, 2008.

BERNAL, J.A.; DÍAZ, C.A. **Tecnología para el cultivo de la curuba**: Manual Técnico. 6. Rio Negro: CORPOICA, 2005.

BIRK, C.D.; PROVENSI, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, p.2285-2291, 2005.

BLOOM, F.E. Neurotransmissão e o Sistema Nervoso Central. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (ed.) **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. Cap. 12, p. 223-243.

BLUMENTHAL, M.; GOLDEBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs**. Austin: American Botanical Council, 2000.

BOER, S.F. de; KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology, **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.145-161, 2003.

BOEIRA, J.M.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L.A.; BARBOSA, P.R.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CORRÊA, A.M.R.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M.P.; PEDROSO, A.P.; GOSMANN, G.; DA SILVA, J.; RATES, S.M.K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.526-532, 2010.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.55-65, 2003.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behavior Brain Research**, v.164, p.266-269, 2005.

BRAGA, A.; STEIN, A.C.; STOLZ, E.D.; DALLEGRAVE, E.; BUFFON, A.; REGO, J.C. DO; GOSMANN, G.; VIANA, A.F.; RATES, S.M.K. Repeated administration of na aqueous spray-dried extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, p.59-66, 2013.

BRASIL. **Farmacopéia brasileira** 5.ed., volume 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, 2010.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (org.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. cap.7, p.297-316.

CAMPBELL, E.L.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A.R. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA_A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v.68, p.1631-1638, 2004.

CARVALHO, R.S.M. de; Duarte, F.S.; LIMA, T.C.M. de. Involvement of GABAergic non-benzodiazepine sites in the anxiolytic-like and sedative effects of the flavonoid baicalein in mice. **Behavioural Brain Research**, v.221, p.75-82, 2011.

CARVALHO-OKANO, R.M.; VIEIRA, M.F. Morfologia externa e taxonomia. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: Tecnologia de Produção**, Pós-colheita, Agroindústria, Mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.33-49, 2001.

CASTRO, P.C.F.; HOSHINO, A.; SILVA, J.C.; MENDES, F.R. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytotherapy Research**, v.21, p.481-484, 2007.

CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil: Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v. 45, p. 1-92, 1997.

CHARNEY, D.S.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Hipnóticos e sedativos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (ed.) **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap.17, p.303-324.

CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.; BAYONOVE, C.L.; BRILLOUET, J.M.; BAUMES, R.L. 6-*O*- α -L-arabinopyranosyl- β -D-glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit. **Phytochemistry**, v.41, n.6, p.1497-1500, 1996.

CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.; BAYONOVE, C.L.; BAUMES, R.L. Identification of passion fruit glycosides by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4352-4357, 1998.

CHASSAGNE, D.; BOULANDER, R.; CROUZET, J. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. **Food Chemistry**, v.66, p.281-288, 1999.

CHITRA, V.; GOWRI, K.; TAMILANBAN, T.; SONI, D. Neuropharmacological screening of aerial parts of *Passiflora incarnata* Linn (Passifloraceae). **Archives of Applied Science Research**, v.1, n.2, p.254-262, 2009.

CHOW, N.K.; FRETZ, M.; HAMBURGER, M.; BUTTERWECK, V. Telemetry as a tool to measure sedative effects of a valerian root extract and its single constituents in mice. **Planta Medica**, v.77, p.795-803, 2011.

COLETA, M; CAMPOSA, M.G.; COTRIM, M.D.; LIMA, T.C.M. de; CUNHA, A.P. da. Assessment of luteolin (3,4,5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. **Behavioural Brain Research**, v.189, p.75-82, 2008.

COLÔMBIA. **Acta 55 da Comisión revisora de productos farmacéuticos, cosméticos, productos naturales**. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Ministerio de Salud, de 13 de Agosto de 1997. Disponível em: <<http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/ACTA55.pdf>>. Acesso em: 19/07/2012.

COLÔMBIA. **Acta 04 de la sala especializada de medicamentos y productos biológicos de la comision revisora**. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Ministerio de Salud, de 25 de Fevereiro de 2004a. Disponível em: <<http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/ceracta042004.pdf>>. Acesso em: 19/07/2012.

COLÔMBIA. **Acta 06 de la sala especializada de medicamentos y productos biológicos de la comision revisora**. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Ministerio de Salud, de 27 de Fevereiro de 2004b. Disponível em: <<http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/ceracta062004.pdf>>. Acesso em: 19/07/2012.

COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C.B.B.; SCHUMACHER, N.S.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v.18, p.106–115, 2014.

COMPAGNONE, R.S.; SUAREZ, A.C.; LEITAO, S.G.; MONACHE, F.D. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from

Clusia columnaris Engl. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.1, p.6-10, 2008.

COSTA, G.M., 2013. **Estudo químico de espécies brasileiras e colombianas do gênero *Passiflora***. Florianópolis, 295p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; ZUCOLOTTI, S.M.; REGINATTO, F.H.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.A.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis. and *Passiflora quadrangularis* Linn. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.36, p.1697–1707, 2013.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v.23, n.5, 2002.

CRYAN, J.F.; MOMBEBEAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, n. 29, p. 571-625, 2005.

CUNHA, N.S. da. **De von Martius aos Ervanários da Bahia**. Bahia: Papalaria dois mundos, 1941.

CUPP, M.J. Herbal remedies: adverse effects and drug interactions. **American Family Physician**, v.59, n.5, p.1239-1244, 1999.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacology**, 25(5): 465-9, 1986.

DE PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.1, p.5-8, 2002.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.148-153, 2010.

DHAWAN, K; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v.72, p.698-702, 2001a.

DHAWAN, K; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.165-170, 2001b.

DHAWAN, K; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. **Fitoterapia**, v.72, p.922-926, 2001c.

DHAWAN, K; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative anxiolytic activity profile of various preparations of *Passiflora incarnata* Linneaus: a comment on medicinal plants' standardization. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.8, n.3, p.283-291, 2002.

DHAWAN, K; KUMAR, S.; SHARMA, A. Evaluation of central nervous system effects of *Passiflora incarnata* in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.2, p.87-91, 2003.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.1-23, 2004.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.371-374, 2005.

DUARTE, F.S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; DE LIMA, T.C.M. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 86, p. 150-161, 2007.

ELSAS, S.M.; ROSSI, D.J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C.A.; GREGORY, W.L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects *in vivo*, varying with extraction method. **Phytomedicine**, v.17, p.940-949, 2010.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Assessment report on *Passiflora incarnata* L., herba.** 2008. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPA_assessment_report/2010/01/WC500059217.pdf>. Acesso em: 11/07/2012.

ESCOBAR, L.A. Passifloraceae. In: PINTO, P.; LOZANO, G. (ed.) **Flora de Colombia**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1988.

ESCAP – EUROPEAN SCIENTIFIC COOPERATIVE ON PHYTOTHERAPY. *Passiflora* herba, Passion flower. In: **ESCAP Monographs**, 2.ed., 2003.

FERNÁNDEZ-BACHILLER, M.I.; PÉREZ, C.; MONJAS, L.; RADEMANN, J.; RODRÍGUEZ-FRANCO, M.I. New tacrine-4-oxo-4*H*-chromene hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and β -amyloid-reducing properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p.1303-1317, 2012.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; GIL-IZQUIERDO, Á. New *C*-Deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.25, p.10187-10193, 2007.

FREITAS, A. de. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento. Núcleo Nacional de Economia da Saúde. 2007.

FROHLICH, O.; DUQUE, C.; SHREIER, P. Volatile constituents of curuba (*Passiflora mollissima*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 421-425, 1989.

GAZOLA, A.C. **Estudo químico das raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata* Cogn.** 2008. 149 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GENNARI, L.; FELLETTI, M.; BLASA, M.; ANGELINO, D.; CELEGHINI, C.; CORALLINIB, A.; NINFALIA, P. Total extract of *Beta vulgaris* var. *cicla* seeds *versus* its purified phenolic components: antioxidant activities and antiproliferative effects against colon cancer cells. **Phytochemical Analysis**, v.22, p.272–279, 2011.

GLUCHOFF-FIASSON, K.; JAY, M.; VIRICEL, M.R. Flavone *O*- and *C*-glycosides from *Setaria italica*. **Phytochemistry**, v.28, n.9, p.2471-2475, 1989.

GOLOUBKOVA, T.D.; HECKLER, E.; RATES, S. M.; HENRIQUES, J. A.; HENRIQUES, A. T. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, n.2, p.141-148, 1998.

GRADOLATTO, A.; CANIVENC-LAVIER, M.C.; BASLY, J.P.; SIESS, M.H.; TEYSSIER, C. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. **Drug Metabolism and Disposition**, v.32, p.58–65, 2004.

GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A., GRIFFITHS, L. R. Identification and simultaneous analysis of hamane, harmine, harmol, isovitexin, and vitexin in *Passiflora incarnata* extracts with a novel HPLC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, p. 2513-2523, 2001.

GRUNDMANN, O.; WANG, J.; MCGREGOR, G.P.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. **Planta Medica**, v.74, p.1769-1773, 2008.

GÜLER, N.F.; ÜBEYLI, E.D. Theory and Applications of Biotelemetry. **Journal of Medical Systems**, v.26, n.2, p.159-178, 2002.

HALLIWELL, J.V.; PLANT, T.D.; ROBBINS, J.; STANDEN, N.B. Voltage clamp techniques. In: OGDEN, D.C. (ed.) **Microelectrode techniques: The Plymouth workshop handbook**. 2.ed. Cambridge: Company of Biologists, 1994. cap.2, p.17-35. Disponível em: <<http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/me.html>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B.A. The mouse light-dark paradigm: a review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.25, p.141-166, 2001.

HENRIQUES, A.t.; Limberger, R.P.; Kerber, V.A.; Moreno, p.r.h. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. Cap.29, p.765-791.

HERDERICH, M.; WINTERHALTER, P. 3-Hydroxy-retro- α -ionol: a natural precursor of isomeric edulans in purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1270-1274, 1991.

HERNÁNDEZ, A.; BERNAL, R. Lista de especies de Passifloraceae de Colombia. **Biota Colombiana**, v.1, n.3, p.320-335, 2000.

ICH - International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)**. Londres, 2005.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of na extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** V.70, n.3, p.718-721, 2006.

JACOB, T.C.; MOSS, S.J.; JURD, R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews: Neuroscience**, v.9, p.331-343, 2008.

JACOBSON, L.H.; CRYAN, J.F. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. **Behavior Genetics**, v.37, p.171-213, 2007.

JUNQUEIRA, N.T.V. et al. Melhoramento genético do maracujá doce. In: MANICA, I. et al. (Org). **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005.

KLEIN, N.; GAZOLA, A.C.; DE LIMA, T.C.M; SCHENKEL, E.; NIEBER, K.; BUTTERWECK, V. Assessment of sedative effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* extracts in mice, measured by telemetry. **Phytotherapy Research**, v.28, p.706–713, 2014.

KILLIP, E.P. **The American Species of Passifloraceae**. v.XIX, Parte II. Chicago: Botanical Series, Field Museum of Natural History, 1938.

KUPFERBERG, H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, 42(Suppl. 4):7–12, 2001

KWON, Y.S.; KIM, E.Y.; KIM, W.J.; KIM, W.K.; KIM, C.M. Antioxidant Constituents from *Setaria viridis*. **Archives of Pharmacal Research**, v.25, n.3, p.300-305, 2002.

LANGASSNER, S.M.Z., 2009. **Avaliação da composição química e atividades biológicas de espécies de Passiflora**. Florianópolis, 166p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

LI, H.; ZHOU, P.; YANG, Q.; SHEN, Y.; DENG, J.; LI, L.; ZHAO, D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.1085-1090, 2011.

LOLLI, L.F.; SATO, C.M.; ROMANINI, C.V.; VILLAS-BOAS, L.B; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W. Possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.308-314, 2007.

LONDEI, T.; VALENTINI, A.M.V.; LEONE, V.G. Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behavior. **Behavioural Brain Research**, v.94, p.249-254, 1998.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, v.2, p.145-181, 1988.

LOSI, G.; PUJA, G.; GARZON, G.; VUONO, M.C. DE; BARALDI, M. Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. **European Journal of Pharmacology**, v.502, p.41-46, 2004.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmakochemische untersuchungen der drogen der gattung *Passiflora*. IV. Mittlg: der vergleich des alkaloidgehaltes in verschiedenen harmandrogen. **Planta Medica**, v. 27, p.381-384, 1975.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. II. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* form *flavicarpa*. **Planta Medica**, v. 27, p.112-121, 1975.

MADÓGLIO, F.A. **Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis**. 2011. 219 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MALUF, E.; BARROS, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. **Phytotherapy Research**, v.5, n.6, p.262-266, 1991.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new *Valeriana* flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, p.537-545, 2003.

MARQUES, L.C.; SOUZA, C.M. Pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos: Relatos de experiência em indústria farmacêutica nacional. **Fitos**, v.7, n.1, p.50-66, 2012.

MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botany, Bronx**, v. 24, p. 333-43, 1970.

MARTÍNEZ, M.C.; FERNANDEZ, S.P.; LOSCALZO, L.M.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A.C.; MARDER, M.; MEDINA, J.H.; VIOLA, H. Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain pERK1/2 levels in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.92, p.291-296, 2009.

MEIER, B. Passiflorae herba – Pharmazeutische Qualität. **Zeitschrift für Phytotherapie** v.16, p.90-99, 1995.

MESKIN, M.; BIDLACK, W.R., DAVIES, A.J.; LEWIS, D.S.; RANDOLPH, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. CRC Press: Boca Raton, 2004.

MÖHLER, H.; RICHARDS, J. G. Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction *in vitro*. **Nature**, v.294, p.763-765, 1981.

MORRONE, M. DA S.; ASSIS, A.M. DE; ROCHA, R.F. DA; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; ZUCOLOTTO, S.M.; CASTELLANOS, L.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.45–51, 2013.

MOVAFEGH, A.; ALIZADEH, R.; HAJIMOHAMADI, F.; ESFEHANI, F.; NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study. **Anesthesia & Analgesia**, v.106, n.6, p.1728-1732, 2008.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in

mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.26 (8 August 2007), 2007. doi:10.1186/1472-6882-7-26.

NASSIRI-ASL, M.; ZAMANSOLTANI, F.; SHARIATI-RAD, S. Possible role of GABAA-benzodiazepine receptor in anticonvulsant effects of Pasipay in rats. **Journal of Chinese integrative medicine**, v.6, n.11, p. 1170-1173, 2008.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NGAN, A.; CONDUIT, R. A double-blind, placebo-controlled investigation of the effects of *Passiflora incarnata* (Passionflower) herbal tea on subjective sleep quality. **Phytotherapy Research**, v.25, p.1153-1159, 2011.

NJUNG'E, K. e HANDLEY, S.L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.38, p.63-67, 1991.

NODA, S.; TANABE, S.; SUZUKI, T. Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.4628-4633, 2012.

OGA, S.; FREITAS, P.C.D. DE; SILVA, A.C.G. DA; HANAD, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v.50, n.4, p.303-306, 1984.

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**, v.25, p.191-193, 1985.

ORSINI, F.; PELLIZZONI, F.; RICCA, G.; VEROTTA, L. Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**, v.26, n.4, p.1101-1105, 1987.

ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P.; ATHAYDE, M.L.; MENTZ, L.A. Brasilianische phytotherapeutika: ihre rolle im arzneimittelmarkt. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 129, n. 35, p. 1847-1848, 1989.

OSORIO, C.; DUQUE, C.; KOAMI, T.; FUJIMOTO, Y. Stereochemistry of (3E)-3,7-dimethyl-3-octene-1,2,6,7-tetraol isolated from *Passiflora quadrangularis*. **Tetrahedron Asymmetry**, v.10, n.22, p.4313-4319, 1999.

OSORIO, C.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. **Phytochemistry**, v.53, n.1, p.97-101, 2000.

OSORIO, C.; DUQUE, C.; SUÁREZ, M.; SALAMANCA, L. E.; URUEÑA, F. Free, glycosidically bound, and phosphate bound flavor constituents of badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. **Journal of Separation Science**, v.25, n.3, p.147-154, 2002.

PAPI, A.; FARABEGOLI, F.; IORI, R.; ORLANDI, M.; DE NICOLA, G.R.; BAGATTA, M.; ANGELINO, D.; GENNARI, L.; NINFALI, P. Vitexin-2-*O*-xyloside, raphasatin and (-)-epigallocatechin-3-gallate synergistically affect cell growth and apoptosis of colon cancer cells. **Food Chemistry**, v.138, p.1521-1530, 2013.

PAVAN, K.R.K.; BHAGAVAN, R.M.; SREEDEVI, P.; PRANALI, P.; VEENA, R.I.; VEENA, G. Phytochemical screening antiepileptic & analgesic activity of leaf extract of *Passiflora foetida*. **Pharmacologyonline**, v.3, p. 576-580, 2009.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M.; WAUTERS, J.N.; TITS, M.; ANGENOT, L.A. HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n.4, p. 241-248, 2004.

PÉREZ, J.O.; D'EECKENBRUGGE, G.C.; RESTREPO, M.; JARVIS, A.; SALAZAR, M.; CAETANO, C. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. **Biota Colombiana**, v.8, n.1, p.1-45, 2007.

PETRY, R.D.1, REGINATTO, F.; DE PARIS F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Comparative pharmacological study of

hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v.15, p.162-164, 2001.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis dom Brasil e das exóticas cultivadas**. 5.v. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.

PRIMOT, S.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; RIOUX, V.; PÉREZ, J. A. C. O.; GARCIN, F. Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el Valle del Cauca (Colombia). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.467-471, 2005.

PROVENSÍ, G.; NOËL, F.; LOPES, D.V.S.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; COSTA, F.; MORAIS, E.C.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. Participation of GABA-benzodiazepine receptor complex in the anxiolytic-like effect of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.6, p.845-851, 2008.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.3-33, 2003.

RAFFAELLI, A.; MONETI, G.; MERCATI, V.; TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, v.777, p.223-231, 1997.

RAMÍREZ, G.C.; GONZÁLEZ, V.F. **La curuba de castilla: Passiflora mollissima (H.B.K.) Bailey**. Bogotá: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, p.1-23, 1997.

RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; LÓPEZ, C.; PALACIOS, L.; DUQUE, C.; PACHECO, R.; GUZMÁN, A. An Orientin Derivative Isolated from *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.1, p.141-143, 2010.

REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEF, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.1, p.32-36, 2001.

REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHRIPEMA, J.; SCHENKEL, E.P. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**, v.15, n.3, p.195-197, 2004.

REGINATTO, F.H.; DE PARIS, F.; PETRY, R.D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G. G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, v.20, n.5, p.348-351, 2006.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.69, n.3, p.153-158, 1994.

REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.6, p.96–100, 1995.

ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W.; OLIVEIRA, R.M.W. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum. Health Science**, v.28, n.2, p.159-164, 2006.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.10, p.685-697, 2011.

RUDNICKI, M.; SILVEIRA, M.M.; PEREIRA, T.V.; OLIVEIRA, M.R.; REGINATTO, F.H.; DAL PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.656-661, 2007.

SAMPATH, C.; HOLBIK, M.; KRENN, L.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* L. in the elevated plus maze in mice. **Phytotherapy Research**, v.25, p.789-795, 2011.

SANDERS-BUSH, E.; MAYER, S.E. Agonistas e Antagonistas dos receptores da 5-hidroxitriptamina (serotonina). In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (ed.) **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap.11, p.205-220.

SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.306-309, 2005.

SANTOS, K.C.; KURTZ, S.M.T.F.; MÜLLER, S.D.; BIAVATTI, M.W.; OLIVEIRA, R.M.M.W.; SANTOS, C.A.M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, p.565-573, 2006.

SANTOSH, P.; VENUGOPL, R.; NILAKASH, A.S.; KUNJBIHARI, S.; MANGALA, L. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.1, 2011.

SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.703-716, 2007.

SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.600-603, 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. Cap.15, p.371-400.

SCHINDLER, S.S. **Catalogue of Brazilian Medicinal Plants: giving a detailed account of their therapeutic properties, uses and doses**. Rio de Janeiro: Typ. E Lith de Moreira, Maximino & Co., 1884.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Rational Phytotherapy: A physicians' guide to herbal medicine**. 4.ed. Spring-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.

SEIGLER, D.S.; PAULI, G.F.; NAHRSTEDT, A.; LEEN, R. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. **Phytochemistry**, v.60, p.873-882, 2002.

SENA, L.M. **Atividade neurofarmacológica do pericarpo dos frutos de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener (maracujá) em camundongos: envolvimento de flavonoides C-glicosídeos**. 2009. 145f. Tese de Doutorado em Farmacologia – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SENA, L.M.; ZUCOLOTTO, S.M.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; LIMA, T.C.M. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* *flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.967-975, 2009.

SHAH, V. P.; YACOBI, A.; BARR, W. H.; BENET, L. Z.; BREIMER, D.; DOBRINSKA, M. R.; ENDRENYI, L.; FAIRWEATHER, W.; GILLESPIE, W.; GONZALES, M. A.; HOOPER, J.; JACKSON, A.; LESKO, L. J.; MIDHA, K. K.; NOONAN, P. K.; PATNAIK, R.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of orally administrated highly variable drugs and drug formulation. **Pharmaceutical Research**, v.13, p.1590-1594, 1996.

SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **The Journal of Psychology**, v.21, p.227-236, 1946.

SIMIRGIOTIS, M.J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E.J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. **Molecules**, v.18, p.1672-1692, 2013.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.11-20, 1997.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997.

SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, n.4, p.794-796, 1983.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta medica**, v.54, n.6, p.488-491, 1988.

SPERONI, E.; BILLI, R.; MERCATI, V.; BONCOMPAGNI, E.; TOJA, E. Sedative effects of crude extracts of *Passiflora incarnata* after oral administration. **Phytotherapy Research**, v.10, p.S92-S94, 1996a.

SPERONI, E.; BILLI, R.; PERELLINO, N.C.; MINGHETTI, A. Role of chrysin in the sedative effects of *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v.10, p.S98-S100, 1996b.

STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON P.; The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, n.3, p.367-70, 1985.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assay of antiepileptic drugs in mice and rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.106, p.319-330, 1952.

TIAN, X.J.; YANG, X.W.; YANG, X.; WANG, K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. **International Journal of Pharmaceutics**, v.367, p.58-64, 2009.

TREIT, D.; PINEL, J.P.; FIBIGER, H.C. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.15, n.4, p.619-626, 1981.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. ***Passiflora: Passionflowers of the world***. Portland: Timber Press, 2004.

ULUBELEN, A.; MABRY, T.J. C-glycosylflavonoids of *Passiflora serratifolia*. **Journal of Natural Products**, v.43, p.162, 1980.

ULUBELEN, A.; AYYILDIZ, H.; MABRY, T.J. C-glycosylflavonoids and other compounds from *Passiflora cyanea*, *P. oerstedii* and *P. menispermifolia*. **Journal of Natural Products**, v.44, p.368-369, 1981.

ULUBELEN, A.; KERR, R. R.; MABRY, T. J. Two new neoflavonoids and C-glycosylflavones from *Passiflora serratodigitata*. **Phytochemistry**, v.21, p.1145-1147, 1982.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manii*. **Journal of Natural Products**, v.45, n.6, p.783, 1982a.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora foetida* var. *hispida* and *P. foetida* var. *hibiscifolia*. **Journal of Natural Products**, v.45, p.103, 1982b.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3.ed. Massachusetts: MIT press, 2000.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v.78, p.112-119, 2007.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111. n.4, p.816-823, 2008.

VIEIRA, R.A. **Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em

Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

WANG, N.; WANG, Y.; LI, P.; PENG, W.; XIE, T.; FENG, Y.; SU, W. The Bioavailability of Hepatoprotective Flavonoids in Hypericum Japonicum Extract. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v.1, p.33-38, 2009.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on selected medicinal plants**. v.1, Geneva, The Organization, 1999.

WILKINSON, G.R. Farmacocinética: Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (ed.) **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

WILLIAMS, P. A.; BUXTON, R. P. Aspects of the ecology of two species of *Passiflora* (*P. mollissima* (Kunth) L. Bailey and *P. pinnatifida* Cav.) as weeds in South Island, New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v.33, p.315-323, 1995.

XU, F.; WANG, C.; YANG, L.; LUO, H.; FAN, W.; ZI, C.; DONG, F.; HUA, J.; ZHOU, J. C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. **Food Chemistry**, v.136, p.94-99, 2013.

YING, X.; GAO, S.; ZHU, W.; BI, Y.; QIN, F.; LI, X.; LI, F. Hight-performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetic study of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma after intravenous administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p. 802-806, 2007a.

YING, X.; LU, X.; SUN, X.; LI, X.; LI, F. Determination of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Talanta**, v.72, p. 1500-1506, 2007b.

- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.9, p.1229-1234, 2000a.
- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.10, p.1377-1380, 2000b.
- ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterization of flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v.71, p.S117-S123, 2000.
- ZHANG, L.Q.; HUANG, Y.D.; YANG, X.W. Intestinal permeability of liquiritin and isoliquiritin in the Caco2 cell monolayer model. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v.19, p.451-458, 2010.
- ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y. FOO, L.Y.; TEHRANI, P.M.; ULREICH, J.B.; WATSON, R.R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v.27, p.408-416, 2007.
- ZUCOLOTTO, S.M.; PALERMO, J.A.; SCHENKEL, E.P. Estudo fitoquímico de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.5-9, 2006.
- ZUCOLOTTO, S.M., GOULART, S., MONTANHER, A., REGINATTO, F.H., SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v.75, p.1221-1226, 2009.
- ZUCOLOTTO, S.M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v.23, p.232-239, 2012.

ANEXOS

Anexo A – Trabalhos publicados em revistas científicas e apresentados em congressos

Trabalhos publicados em revistas científicas

1. KLEIN, N.; GAZOLA, A.C.; LIMA, T.C.M.; SCHENKEL, E.P.; NIEBER, K.; BUTTERWECK, V. Assessment of sedative effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* extracts in mice, measured by telemetry. *Phytotherapy Research*, v. 28, p. 706-713, 2014.
2. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; ZUCOLOTTI, S.M.; REGINATTO, F.H.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.A.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* Linn. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 36, p. 1697-1907, 2013.

Trabalhos apresentados em congressos

1. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; ZUCOLOTTI, S.M.; Castellanos, L.; RAMOS, F.A.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P. Estudio fitoquímico de algunas especies brasileiras y colombianas del género *Passiflora*. In: XII Congresso Colombiano de Fitoquímica: Tradición e Innovación en Productos Naturales 2014, Cartagena de Indias - Colômbia. Resumos, 2014.
2. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; Castellanos, L.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.. Aislamiento de seis flavonoides C-glicósidos de *Passiflora bogotensis* Benth. por cromatografía contracorriente de alta velocidad con elución de gradiente. In: XXII Congresso italo-latinoamericano de etnomedicina - SILAE, 2013, Puntarenas - Colômbia. Resumos, 2013.

3. GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; MADÓGLIO, F.A.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; LIMA, T.C.M. Hypnosedative activity of *P. alata* and its correlation with apigenin. In: 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA Congress, 2013, Münster – Alemanha. *Planta Medica*, v.79, n.13, PB19: Book of Abstracts, 2013.
4. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; ZUCOLOTTTO, S.M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.A.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P. Análisis de alcaloides en espécies de *Passiflora* por técnicas cromatográficas y electroforéticas. In: 1er. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos, 2013, Bogotá - Colômbia. Resumos, 2013.
5. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; LANGASSNER, S.M.Z.; MADÓGLIO, F.A.; DUQUE, C.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P. Cuantificación de apigenina por HPLC-DAD en extractos sedantes de *Passiflora*. In: XV Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana – FEFAS, 2012, Cartagena de Indias - Colômbia. Resumos, 2012.
6. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; ZUCOLOTTTO, S.M.; MADÓGLIO, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; RAMOS, F.A.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P. Quantificação de apigenina por HPLC-DAD em extratos de *Passiflora* com atividade sedativa. In: XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO, 2012, Florianópolis. Resumos, 2012.
7. GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; COSTA, G.M.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; LIMA, T.C.M. The putative hypnosedative activity of *P. alata*. In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves. Resumos, 2012.
8. GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; COSTA, G.M.; FAGUNDES, C.; DE PIERI, C.H.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; LIMA, T.C.M. The putative

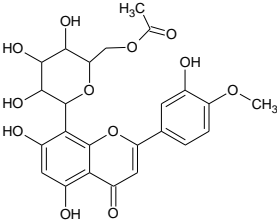
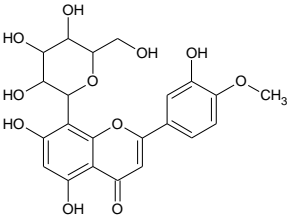
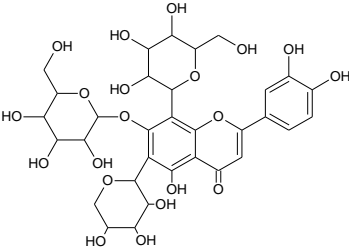
hypnosedative activity of the aqueous extract from the pericarp of *P. alata*. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2011, Rio de Janeiro. Resumos, 2011.

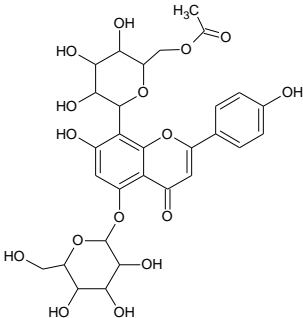
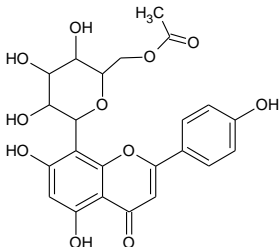
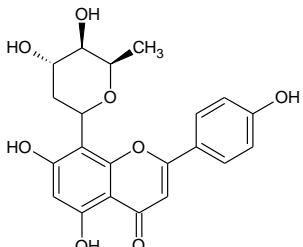
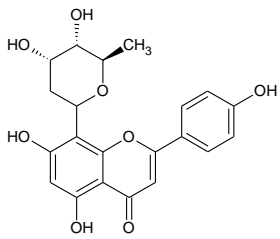
9. COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; LANGASSNER, S.M.Z.; REGINATTO, F.H.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Comparación de los perfiles de flavonoides y saponinas de *Passiflora quadrangularis* Linn. y *Passiflora alata* Curtis por HPLC-DAD. In: XI Congresso colombiano de fitoquímica, 2011, Medellín - Colômbia. Resumos, 2011.

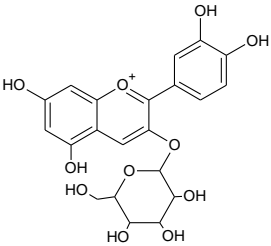
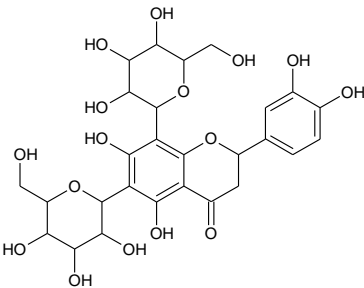
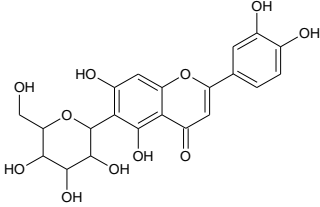
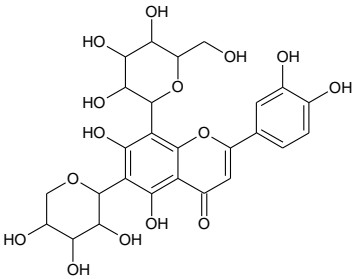
APÊNDICES

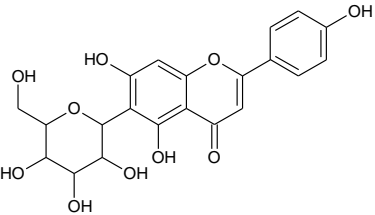
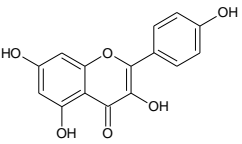
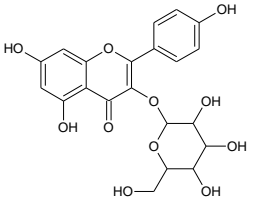
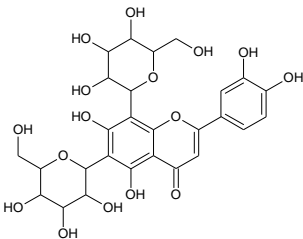
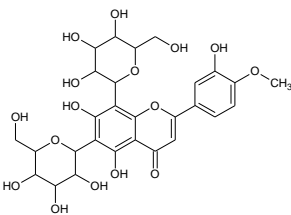
Apêndice A – Quadro descritivo apresentando as estruturas químicas dos principais metabólitos químicos das espécies de *Passiflora* utilizadas

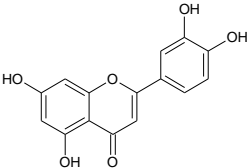
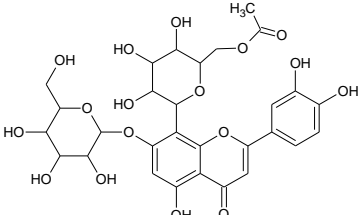
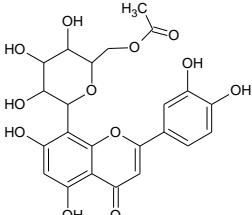
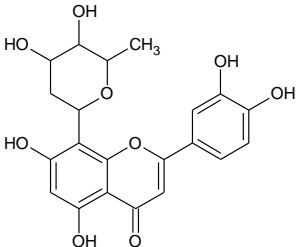
Quadro B: Quadro descritivo apresentando as estruturas químicas dos principais metabólitos químicos das espécies de *Passiflora* utilizadas no presente trabalho doutoral descritos previamente na literatura*.

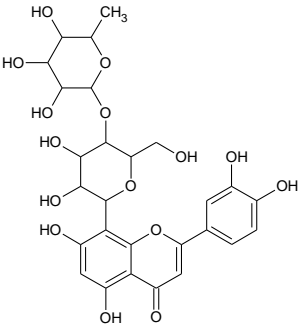
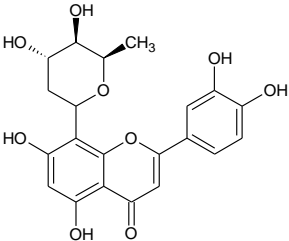
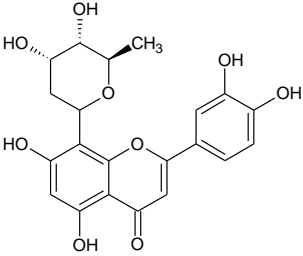
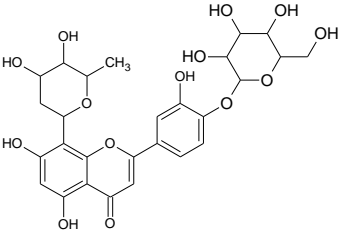
Flavonoides	
Espécies	Compostos
<i>P. tripartita f. mollissima</i> (RAMOS et al., 2010)	 4'-O-metil-luteolina-8-C-6''-acetilglicopiranosídeo
<i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)	 4'-metil-luteolina-8-C-β-d-glicopiranosídeo
<i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)	 7-O-glicosil-isoschaftosídeo

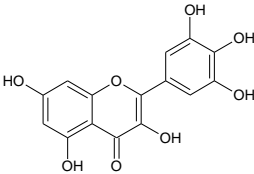
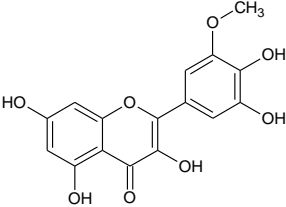
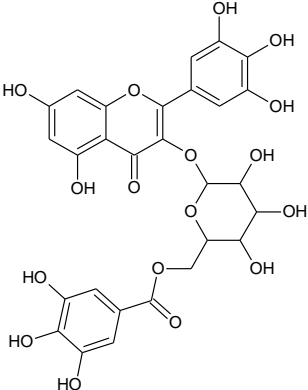
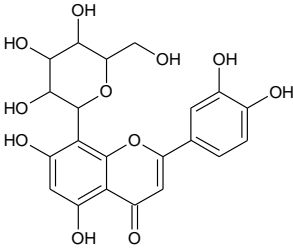
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Apigenina-5-<i>O</i>-β-d-glicopiranosil-8-<i>C</i>-(6''acetil)-β-d-glicopiranosídeo</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Apigenina-8-<i>C</i>-(6''acetil)-β-d-glicopiranosídeo</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (XU et al., 2013)</p>	 <p>Apigenina-8-<i>C</i>-β-boivinopiranosídeo</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (XU et al., 2013)</p>	 <p>Apigenina-8-<i>C</i>-β-digitoxipiranosídeo</p>

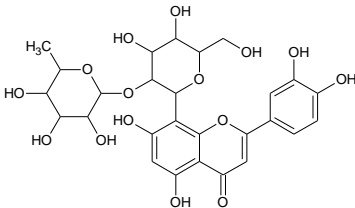
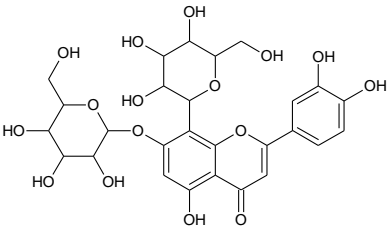
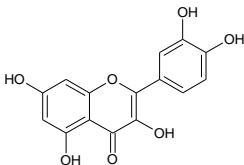
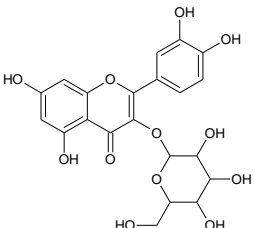
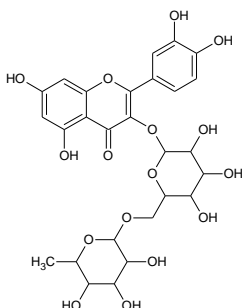
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	 <p>Cyanidina-3-<i>O</i>-glicosídeo</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Eriodictiol-6,8-di-<i>C</i>-glicosídeo</p>
<p><i>P. alata</i> (COLOMEU et al., 2014; DOYAMA et al., 2005; PEREIRA et al., 2004) <i>P. edulis f. edulis</i> (ICHIMURA et al., 2006) <i>P. manicata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002) <i>P. tripartita f. mollissima</i> (ZUCOLOTTO et al., 2012)</p>	 <p>Isoorientina</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Isoschaftosídeo</p>

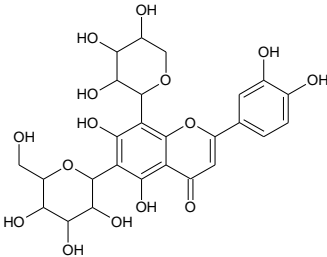
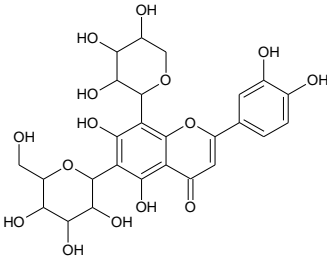
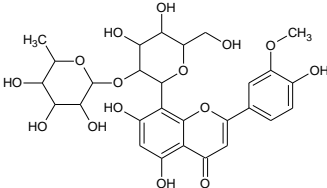
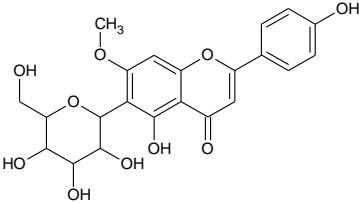
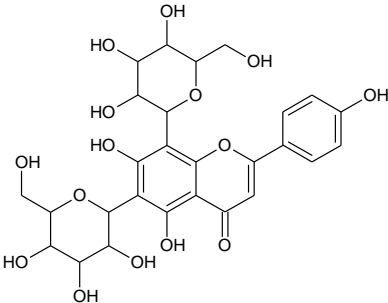
<p><i>P. alata</i> (COLOMEU et al., 2014; DOYAMA et al., 2005; ULUBELEN et al., 1982)</p> <p><i>P. manicata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002; MORRONE et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012)</p> <p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002; ZUCOLOTTO et al., 2012)</p>	 <p>Isovitexina</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	 <p>Canferol</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	 <p>Canferol-3-<i>O</i>-glicosídeo</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Leucenina II</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Leucenina II-4'-metil éter</p>

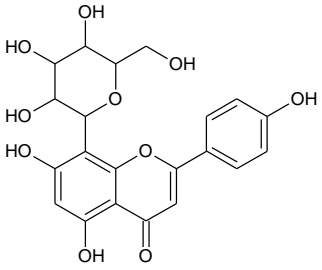
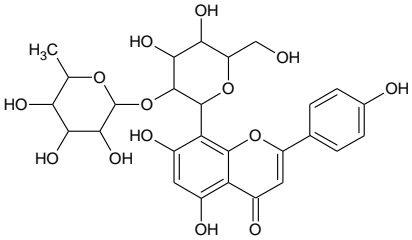
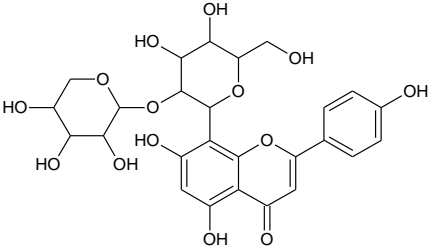
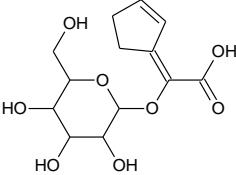
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ICHIMURA et al., 2006)</p>	<div><p>Luteolina</p></div>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	<div><p>Luteolina-7-<i>O</i>-glicopiranosil-8-<i>C</i>-(6''acetil)-glicopiranosídeo</p></div>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	<div><p>Luteolina-8-<i>C</i>-(6''acetil)-β-d-glicopiranosídeo</p></div>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	<div><p>Luteolina-8-<i>C</i>-digitoxosídeo</p></div>

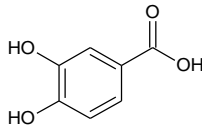
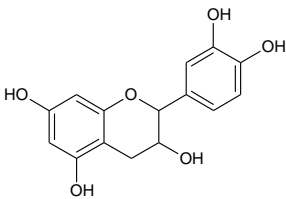
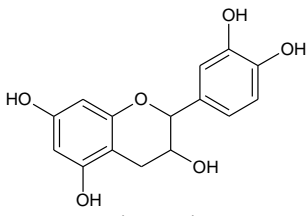
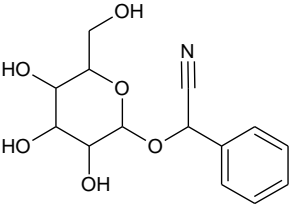
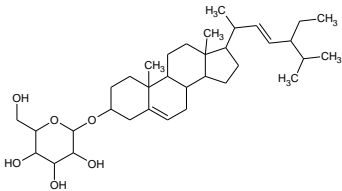
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	 <p>Luteolina-8-C-neohesperosídeo</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (XU et al., 2013)</p>	 <p>Luteolina-8-C-β-boivinopiranosídeo</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (XU et al., 2013)</p>	 <p>Luteolina-8-C-β-digitoxipiranosídeo</p>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (XU et al., 2013)</p>	 <p>Luteolina-8-C-β-digitoxipiranosil-4'-O-β-d-glicopiranosídeo</p>

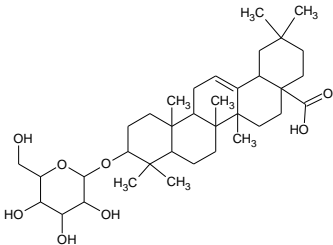
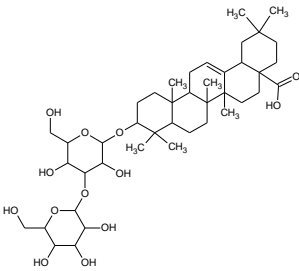
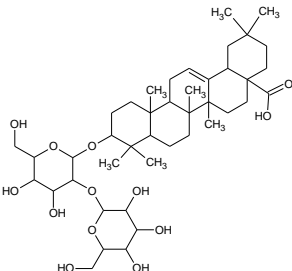
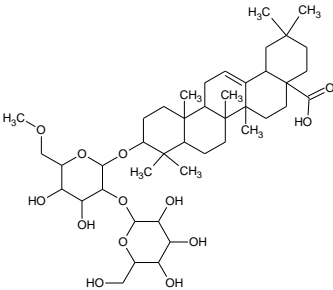
<p><i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Miricetina</p>
<p><i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Miricetina-3'-<i>O</i>-metil éter</p>
<p><i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Miricetina-3-<i>O</i>-(6''-galoil)-glicosídeo</p>
<p><i>P. alata</i> (PEREIRA et al., 2004; ULUBELEN et al., 1982; ZUCOLOTTTO et al., 2012) <i>P. manicata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002) <i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013; ZUCOLOTTTO et al., 2012)</p>	 <p>Orientina</p>

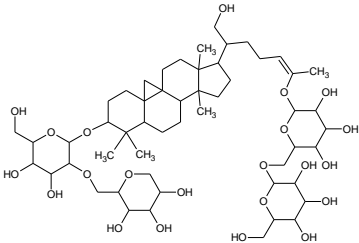
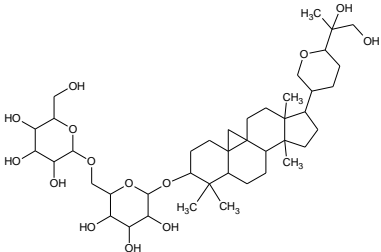
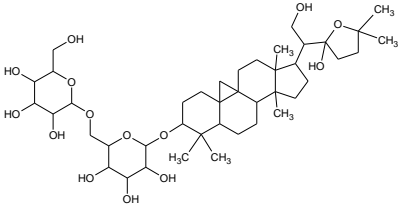
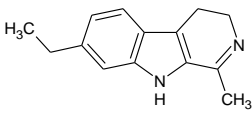
<p><i>P. alata</i> (DOYAMA et al., 2005)</p>	 <p>Orientina-2''-O-ramnosídeo</p>
<p><i>P. tripartita</i> f. <i>mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Orientina-7''-O-glicosídeo</p>
<p><i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> (ZIBALDI et al., 2007)</p>	 <p>Quercetina</p>
<p><i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> (ZIBALDI et al., 2007)</p>	 <p>Quercetina-3-O-glicosídeo</p>
<p><i>P. alata</i> (PEREIRA et al., 2004; MADÓGLIO, 2011)</p>	

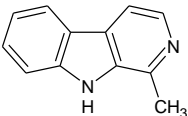
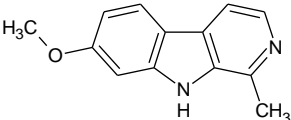
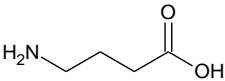
	<p>Rutina</p>  <p>Schaftosídeo</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013)</p>	 <p>Schaftosídeo</p>
<p><i>P. alata</i> (DOYAMA et al., 2005)</p>	 <p>Scoparina-2''-O-ramnosídeo</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (ZUCOLOTTO et al., 2012)</p>	 <p>Swertisina</p>
<p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (ZUCOLOTTO et al., 2012)</p>	 <p>Vicenina-2</p>

<p><i>P. alata</i> (COLOMEU et al., 2014; OGA et al., 1984; PEREIRA et al., 2004; ULUBELEN et al., 1982)</p> <p><i>P. manicata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002; ZUCOLOTTO et al., 2012)</p> <p><i>P. tripartita f. mollissima</i> (SIMIRGIOTIS et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012)</p>	 <p>Vitexina</p>
<p><i>P. alata</i> (DOYAMA et al., 2005; COSTA et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012)</p> <p><i>P. manicata</i> (ZUCOLOTTO et al., 2012)</p> <p><i>P. quadrangularis</i> (COSTA et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012)</p>	 <p>Vitexina-2''-O-ramnosídeo</p>
<p><i>P. alata</i> (ULUBELEN et al., 1982)</p> <p><i>P. quadrangularis</i> (COSTA et al., 2013)</p>	 <p>Vitexina-2''-O-xilosídeo</p>
Outros compostos fenólicos	
Especies	Compostos
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	 <p>Ácido edulífico</p>

<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	<div><p>Ácido protocatéquico</p></div>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	<div><p>Catequina</p></div>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	<div><p>Epicatequina</p></div>
<p><i>P. edulis f. edulis</i> (ZIBADI et al., 2007)</p>	<div><p>Prunasina</p></div>
<p>Saponinas</p>	
<p>Espécies</p>	<p>Compostos</p>
<p><i>P. alata</i> (REGINATTO et al., 2001)</p>	<div><p>3-<i>O</i>-β-d-glicopiranosilestigmasterol</p></div>

<p><i>P. alata</i> (REGINATTO et al., 2001)</p>	 <p>Ácido 3-<i>O</i>-β-d-glicopiranosil-oleanólico</p>
<p><i>P. alata</i> (REGINATTO et al., 2001)</p>	 <p>Ácido 3-<i>O</i>-β-d-glicopiranosil-(1→3)-β-d-glicopiranosil-oleanólico</p>
<p><i>P. alata</i> (DOYAMA et al., 2005; REGINATTO et al., 2001)</p>	 <p>Ácido 3-<i>O</i>-β-d-glicopiranosil-(1→2)-β-d-glicopiranosil-oleanólico</p>
<p><i>P. quadrangularis</i> (ORSINI et al., 1987)</p>	 <p>Ácido oleanólico-3-soforosídeo</p>

<p><i>P. alata</i> (DOYAMA et al., 2005; REGINATTO et al., 2001; 2004) <i>P. quadrangularis</i> (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985)</p>	 <p>9,19-ciclolanostano-24Z-en-3β,21,26-tri- hidróxi-3,26-di-O-gentiobiosídeo (quadrangulosídeo)</p>
<p><i>P. quadrangularis</i> (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985)</p>	 <p>9,19-ciclolanostano-21,24-epoxi-3β,25,26- tríol-3β-O-gentiobiosídeo</p>
<p><i>P. quadrangularis</i> (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985)</p>	 <p>9,19-ciclolanostano-22,25-epoxi- 3β,21,22(R)-tríol-3β-O-gentiobiosídeo</p>
<p>Alcaloides</p>	
<p>Espécies</p>	<p>Compostos</p>
<p><i>P. alata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002)</p>	 <p>Harmalina</p>

<p><i>P. alata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002; OGA et al., 1984)</p>	 <p>Harmana</p>
<p><i>P. alata</i> (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002)</p>	 <p>Harmina</p>
<p>Aminoácidos</p>	
<p>Espécies</p>	<p>Compostos</p>
<p><i>P.edulis f. edulis</i> (ICHIMURA et al., 2006)</p>	 <p>GABA</p>

*Além dos metabólitos apresentados no quadro, compostos voláteis também foram identificados por outros autores nas espécies de *Passiflora* utilizadas no presente estudo.